



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

**DESARROLLO DE MODELOS CELULARES PARA EL
ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS
BASADOS EN EL USO DE CÉLULAS MESENQUIMALES
OVINAS: OBTENCIÓN, ESTUDIO Y
CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES
OVINAS**

Autor

DIEGO RUBÉN MEDIANO MARTÍN-MAESTRO

MÁSTER EN INICIACIÓN A LAS CIENCIAS VETERINARIAS

Directoras

INMACULADA MARTÍN BURRIEL
ROSA MARIA BOLEA BAILO

Facultad de Veterinaria
2012

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 Enfermedades Priónicas.....	4
2.1.1 Agente causal: teoría de la proteína prión.....	6
2.1.3 Expresión y funciones de PrP ^C	8
2.1.4 Alteraciones de la función fisiológica y neurodegeneración	9
2.2 Scrapie.....	11
2.2.1 Características clínicas del scrapie	12
2.2.2 Diagnóstico de scrapie	13
2.2.3 Aislados priónicos asociados a la enfermedad de scrapie	16
2.2.4 Susceptibilidad genética a scrapie	18
2.2.4.1 Estructura del gen PRNP	18
2.2.4.2 Susceptibilidad a las formas clásicas de scrapie.....	19
2.2.4.3 Susceptibilidad a otras cepas priónicas	20
2.3 Modelos celulares para el estudio de las enfermedades priónicas.....	21
2.3.1. Líneas celulares murinas.....	21
2.3.2. Cultivos neuronales primarios	22
2.3.3. Cultivos de células troncales neuronales	23
2.3.4. Cultivos de células troncales mesenquimales	24
2.4. Células Mesenquimales	25
2.4.1 Fuentes de obtención de MSC	27
2.4.2 Caracterización	27
2.4.2.1 Capacidad de proliferación	28
2.4.2.2 Fenotipo	28
2.4.2.3 Potencial de diferenciación	29
Diferenciación adipogénica	30
Diferenciación osteogénica	31
Diferenciación condrogénica	31
2.4.3 Plasticidad de las MSC	32
3 OBJETIVOS DEL ESTUDIO	34
4 METODOLOGÍA.....	35
4.1 Cultivo de MSC	35
4.1.1 Obtención de muestras y aislamiento de MSC ovinas.....	35
4.1.2 Expansión y criopreservación de MSC.....	37
4.1.3 Caracterización de las MSC.....	37
4.1.3.1 Capacidad de proliferación	38
4.1.3.2 Expresión de marcadores de superficie	38
4.1.3.3 Capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos	39

<i>Diferenciación adipogénica</i>	39
<i>Diferenciación osteogénica</i>	39
<i>Diferenciación condrogénica</i>	40
4.1.4 Capacidad de transdiferenciación neurogénica.....	40
4.2 Análisis de la expresión génica	41
4.2.1 Extracción de RNA y síntesis de DNA complementario.....	41
4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa.....	42
4.2.2.1 <i>Diseño y optimización de cebadores</i>	42
4.2.2.2 <i>PCR convencional</i>	43
4.2.2.3 <i>Secuenciación automática</i>	45
4.2.2.4 RT-qPCR	45
4.3 Análisis de expresión de PrP^C mediante Dot Blotting	46
4.4 Infección de las MSC	47
4.4.1 Inoculación con scrapie.....	47
4.4.2 Determinación de PrP ^{Sc} mediante Western Blotting	48
4.5 Herramientas bioinformáticas	49
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
5.1 Aislamiento y diferenciación de MSC	50
5.1.1 Capacidad de proliferación	51
5.1.2 Expresión de marcadores celulares de superficie mesenquimales.....	52
5.1.3 Potencial adipogénico	54
5.1.4 Potencial osteogénico	55
5.1.5 Potencial condrogénico	56
5.2 Diferenciación neurogénica	60
5.3 Infección de MSC con aislado priónico de scrapie clásico	64
6 CONCLUSIONES	68
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. RESUMEN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (**TSE**) son enfermedades neurodegenerativas fatales para las cuales no existe tratamiento. En las últimas décadas se han desarrollado modelos celulares tanto para el estudio de los mecanismos moleculares de la enfermedad como para su posible aplicación en el diagnóstico precoz y para la evaluación de tratamientos *in vitro*. Sin embargo, existen muy pocos modelos celulares capaces de multiplicar la proteína prión patológica, la mayoría son derivados murinos que requieren la adaptación previa del aislado priónico en ratón antes de su multiplicación.

El objetivo final del presente estudio consiste en desarrollar un modelo celular que permita estudiar el scrapie en células procedentes del hospedador natural de la enfermedad, el ovino. Para ello se han estudiado y caracterizado las células mesenquimales (**MSC**) ovinas obtenidas a partir de sangre periférica y médula ósea. Se ha elegido la sangre periférica como tejido de fácil acceso, y la médula ósea por considerarse el lugar de mayor concentración de MSC en animales adultos. En las TSE la proteína prión patológica se acumula principalmente en el Sistema Nervioso Central y es allí donde ejerce su acción patológica, por ello se ha analizado la plasticidad de las MSC ovinas para su diferenciación neurogénica. Por otra parte, se ha estudiado la susceptibilidad de estas células frente a la infección con el agente del scrapie.

En este trabajo se describe por primera vez la posibilidad de aislar MSC a partir de sangre periférica de ovino. Las MSC ovinas de ambos orígenes expresan a nivel de transcritos marcadores de superficie característicos de células mesenquimales. Tal y como se ha descrito en otras especies, se ha observado gran variabilidad individual de las MSC ovinas, que parece afectar tanto a la capacidad de diferenciación como a la plasticidad de estas células. Ambos tipos de MSC expresan la proteína prión celular y son susceptibles a la infección con aislados priónicos de scrapie. Estas características indican la idoneidad de las MSC ovinas como modelo celular en el hospedador natural de la enfermedad de scrapie.

2. INTRODUCCIÓN

En este primer apartado se expondrán distintos aspectos de las encefalopatías espongiformes transmisibles, principalmente el scrapie ovino y los modelos celulares desarrollados para el estudio de estas. Dentro de estos modelos se profundizará en la posible aplicación de las células madre en el desarrollo de los mismos, y por último se detallarán los tipos y características de las células madre mesenquimales.

2.1 Enfermedades Priónicas

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles son un grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales. Las enfermedades priónicas pueden presentarse de forma hereditaria, debidas a la mutación del gen que codifica la proteína prión (**PRNP**); adquiridas, cuando son el producto de una infección con el agente causal; y esporádicas, sin una causa aparente conocida. Todas ellas comparten la transformación de la estructura de la Proteína Prión Celular (**PrP^C**) en Proteína Prión Patológica (**PrP^{Sc}**), que se caracteriza por un alto contenido en láminas β sin que se vea afectada la estructura primaria. La **PrP^{Sc}** se acumula principalmente en el cerebro de los individuos afectados en una forma insoluble a detergentes y resistente a proteasas [1]. Las TSE están relacionadas con un grupo de enfermedades denominadas «conformacionales» en la especie humana, como son la enfermedad de Alzheimer, la de Parkinson o la corea de Huntington, que surgen como consecuencia del plegamiento anómalo de una proteína específica. Este cambio de conformación causa la enfermedad, bien por la adquisición de una actividad tóxica o por la pérdida de función de la proteína normal [2].

Entre las TSE que afectan a la especie humana se incluyen la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (**CJD**), el kuru, o el Insomnio Familiar Fatal (**IFF**). Entre las enfermedades que afectan a los animales se encuadra la Encefalopatía Espongiforme Bovina (**BSE**). Patología que además de afectar al ganado bovino, ha dado lugar a una nueva patología humana, la nueva variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (**vCJD**), considerada zoonosis [3]. También se describen dentro de este grupo la

enfermedad caquetizante de los ciervos y el scrapie ovino y caprino, considerado el scrapie como origen de la BSE [4].

El análisis histopatológico de los cerebros de los animales muertos por BSE reveló una gran similitud con los cerebros de los animales infectados con scrapie. Además, estudios epidemiológicos demostraron que el vehículo de infección de la BSE fueron las harinas de carne y hueso utilizadas en los piensos en granjas de rumiantes, sospechando que estos suplementos estaban contaminados con el agente causante de la enfermedad en ovino. Es probable que el reciclaje del material infectado provocara una contaminación masiva de estas harinas, dando lugar a una epidemia de BSE con un máximo de casos en 1992 en Reino Unido. Su extensión a otros países de Europa fue probablemente debida a la exportación de ganado infectado y de harinas contaminadas desde países con BSE, principalmente Reino Unido [5-7].

El origen de la vCJD se ha atribuido a la exposición a altas concentraciones de productos contaminados con BSE a finales de los años 80, que ha permitido al agente infeccioso atravesar la barrera de especies entre el ganado vacuno y el hombre. Al parecer, la similitud estructural de los priones de ambas especies podría haber facilitado la transmisión de la enfermedad a los humanos [8-11]. Todas las investigaciones neuropatológicas realizadas sobre cerebros de animales y humanos llevaron a concluir que los distintos procesos neurológicos poseían una base molecular muy similar. En todas las muestras analizadas se detectó una degeneración espongiiforme característica, por lo que a este grupo de enfermedades se le denominó Encefalopatías Espongiiformes Transmisibles [12].

Las TSE se caracterizan por un curso progresivo y fatal, mostrando las siguientes características:

- Poseen períodos de incubación largos y variables (de meses a años), dependientes del huésped, de la cepa del agente causal y de la vía de transmisión.
- Son causadas por un agente no convencional altamente resistente a procedimientos físicos y químicos que inactivan bacterias, virus o viroides, y es sensible a tratamientos que alteran las proteínas [13].
- Tienen carácter transmisible de forma experimental o natural [14-16].

- No se ha observado una respuesta inflamatoria clásica mediada por antígeno detectable en el huésped [17, 18, revisado por 19].
- Producen un cuadro lesional caracterizado por una vacuolización espongiiforme localizada principalmente en el tronco del encéfalo, neuropilo de la sustancia gris y pericarión de las neuronas [20-22].

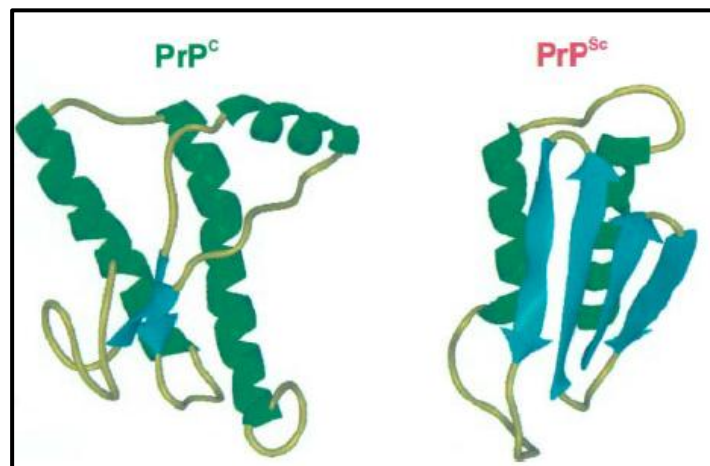
2.1.1 Agente causal: teoría de la proteína prión

Inicialmente, se asumió que el agente responsable de las TSE era un lentivirus [23, 24]. Sin embargo, a partir de los experimentos con radiación ultravioleta sobre suspensiones de extractos de cerebros infectados de ratón, Alper y colaboradores concluyeron que la replicación del agente causante de scrapie no dependía de un ácido nucleico [25, 26]. Con estos resultados, Griffith postuló la hipótesis de una naturaleza proteica [27], como habían sugerido también Pattison y Jones [28]. Posteriormente el equipo de Prusiner, tras varios años de experimentos biofísicos y bioquímicos, consiguió aislar una glicoproteína resistente a proteasas a partir de cerebros de hámster infectados. Esta proteína era la predominante de la partícula infecciosa y se acumulaba en cerebros afectados, a veces en forma de placas amiloides. Prusiner introdujo el término «prión» para distinguir al agente de otros patógenos como virus o viroides y lo definió como «pequeña partícula infecciosa proteica que es resistente a procesos de inactivación de ácidos nucleicos» [29, 30]. El agente del scrapie demostró resistencia a muchos tratamientos aplicados para degradar ácidos nucleicos, como son los grandes cambios de pH, nucleasas, fosfodiesterasas, hidroxilamina, radiaciones ultravioleta e ionizantes, hidrólisis con $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ e inactivación fotoquímica con psoralenos. Aunque existen virus que son resistentes a algunos de estos compuestos o procesos, no se conoce ninguno que resista a todos ellos.

El componente proteico aislado y purificado de los cerebros afectados tiene un peso molecular de 27-30 kDa y es totalmente resistente a la digestión con proteinasa K [29], por ello se le denominó PrP^{27-30} o PrP^{res} . La determinación de algunos aminoácidos del extremo N-terminal de esta proteína permitió la clonación del **cDNA** (Ácido Desoxirribonucleico Complementario, *complementary Deoxyribonucleic Acid*) codificante. El gen de PrP^{res} fue localizado en el genoma del propio huésped y se descubrió que este péptido era en realidad un fragmento de otra molécula mayor (de 33-

35 kDa) llamada PrP^{Sc} (de scrapie) [31, 32]. Además, el gen que codifica la proteína PrP (*PRNP*) se encontró en todas las especies susceptibles de contraer una TSE y se comprobó que la proteína se expresaba de forma fisiológica en muchos tejidos de organismos sanos, con niveles más elevados en el cerebro [31, 33]. La proteína presente en los animales sanos es proteasa-sensible y se le conoce como PrP^{sen} o PrP^C y su secuencia primaria es idéntica a la de PrP^{Sc} [34]. Las diferentes propiedades de la proteína normal y la patológica son debidas a las diferencias en la conformación tridimensional (Figura 1).

Figura 1. Modelos de las conformaciones terciarias de la proteína prión celular (PrP^C) y la proteína prión patológica (PrP^{Sc}). En verde están representadas las estructuras de hélice- α y en azul las de lámina- β [12].



Investigaciones más recientes constituyen un nuevo sustento a la hipótesis priónica, ya que por fin se demuestra la generación *in vitro* de partículas infecciosas. Como ejemplo, una proteína PrP^C recombinante en ratón producida en *Escherichia coli* convertida en PrP infecciosa capaz de causar un fenotipo similar a la enfermedad priónica en ratones [35]. Además, Castilla y colaboradores consiguieron generar partículas PrP^{res} *in vitro* mediante una técnica de amplificación cíclica (**PMCA**: *protein misfolding cyclic amplification*) y la inoculación de estas partículas en hámster provocaron una patología típica de scrapie e idéntica a la desencadenada por inoculación de material infeccioso de cerebro en los mismos animales [36].

Las hipótesis alternativas a la teoría de la proteína prión surgen como solución a algunos aspectos difíciles de explicar por la hipótesis priónica, como por ejemplo el

mecanismo de patogénesis tipo vírico de las infecciones priónicas, la existencia de varias cepas responsables de diferentes tiempos de incubación y perfiles neuropatológicos, y el hecho de que el desarrollo de la enfermedad no se relacione directamente con la presencia de PrP^{res} en algunos casos [37, 38].

2.1.3 Expresión y funciones de PrP^C

La proteína PrP^C se expresa en etapas tempranas de la embriogénesis y en el adulto presenta los mayores niveles en el Sistema Nervioso Central (SNC) [39, 40]. Se ha detectado en grandes cantidades en las membranas sinápticas de las neuronas [41] y en los astrocitos [42]. Además la proteína se expresa de forma abundante en una amplia variedad de tejidos y tipos celulares incluyendo músculo esquelético, intestino, riñón, corazón, tejidos linfoides, útero, testículos, linfocitos, eritrocitos y células presentadoras de antígeno, como son las células dendríticas y los monocitos. La proteína PrP^C también se ha encontrado en forma soluble en fluidos corporales como plasma sanguíneo, leche y líquido cefalorraquídeo [43-47].

Así, la proteína PrP^C parece desarrollar un importante papel en la propagación y acumulación de su forma patológica en las TSE, pero el conocimiento de sus funciones fisiológicas sigue sin conocerse con exactitud. No obstante, se han descrito diversas funciones biológicas deducidas por la expresión ubicua de PrP^C, su interacción con determinados ligandos, y por los efectos observados en su ausencia en animales de laboratorio.

En primer lugar se ha pensado que la proteína puede tener un papel en el desarrollo del SNC y en la neurogénesis, posiblemente debido a su unión con la molécula de adhesión celular neural (**N-CAM**) [48-50]. Además, parece ser que PrP^C está implicada en la transmisión sináptica y reorganización del circuito neuronal en el hipocampo. También puede ocuparse del mantenimiento de las corrientes de K⁺ activadas por Ca²⁺ de células piramidales CA1 del hipocampo e intervenir en la inhibición mediada por receptores GABA. Existen estudios que indican el normal comportamiento de animales carentes de la proteína prión celular [51], en cambio, otros estudios describen alteraciones en funciones fisiológicas, incluyendo la regulación de los ritmos circadianos, la formación de la memoria y la función cognitiva [52-54].

Es importante señalar el papel neuroprotector de PrP^C, mediado por vías de transducción de la señal desde la superficie celular. Posee función antioxidante, actuando como regulador del nivel de cobre intracelular [55] de modo que puede actuar sobre la actividad citosólica de la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu/ZnSOD), y por otro lado puede actuar además a nivel de la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS). También actuaría atenuando de los efectos apoptóticos de la proteína Doppel [56], e inhibiendo a Bax, impidiendo la apoptosis a través de la vía mitocondrial [57, 58], previniendo la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Esta función protectora podría explicar los bajos niveles de apoptosis observados en la enfermedad de scrapie natural, a pesar de la inducción de Bax [59-61].

Los altos niveles de expresión de PrP^C en los órganos linfoides y en varios tipos de células del sistema inmune sugieren funciones biológicas en el sistema inmunológico, si bien éstas no están claramente definidas. Por un lado, en el sistema inmune innato PrP^C se expresa constitutivamente en células presentadoras de antígeno. Recientemente se ha estudiado la posible contribución de la proteína en las interacciones de células T con células dendríticas mediadas por el complejo mayor de histocompatibilidad. Así, se ha observado que la ausencia de PrP^C en células dendríticas provoca una respuesta reducida de los linfocitos T [62]. Por otro lado, algunos investigadores han observado, tanto *in vitro* como *in vivo*, una mayor actividad fagocítica en macrófagos/monocitos de ratones deficientes en PrP^C [63].

2.1.4 Alteraciones de la función fisiológica y neurodegeneración

Hasta el momento, al igual que lo ocurrido en otras enfermedades neurodegenerativas que cursan con la acumulación de proteínas con un plegamiento anómalo [2], los estudios neuropatológicos no han podido determinar con exactitud si el acúmulo de proteínas alteradas en el cerebro está directamente implicado en esta pérdida neuronal, o es la falta de la proteína normal la responsable de dicha pérdida. A continuación se describen los posibles mecanismos que conducen a la pérdida neuronal:

- **Ganancia de actividad tóxica:** Esta hipótesis propone que el plegamiento anormal y la agregación conllevan la adquisición de propiedades neurotóxicas por la proteína anómala. Así, agregados de PrP^{Sc} pueden bloquear el transporte axonal,

interferir con la función sináptica o desencadenar procesos apoptóticos. Al menos se han propuesto cuatro mecanismos para explicar la actividad tóxica de los agregados de PrP^{Sc} y de otras proteínas anómalas causantes de enfermedades neurodegenerativas:

- Activación de vías de señalización apoptótica: [68, 69].
- Reclutamiento de factores esenciales: [70, 71].
- Disrupción de la membrana y despolarización: [72, 73].
- Inducción de estrés oxidativo: [74-76].
- Pérdida de la función neuroprotectora de la PrP^C: [77].

Cabe mencionar una incompatibilidad con esta teoría, y es la ausencia de fenotipo patológico característico de TSE en ratones sin expresión de PrP^C. [51, 78, 79]. No obstante, si que se describieron alteraciones en los ritmos de ciclos circadianos y del sueño en estos animales [54] . Según este hecho, la actividad neuroprotectora de PrP^C, siendo prescindible, puede convertirse en esencial bajo condiciones de estrés celular en el organismo enfermo.

- **Función tóxica de la PrP^C:** esta hipótesis se basa en el cambio o subversión de la función neuroprotectora de PrP^C. Se ha descrito como la sobreexpresión de PrP^C tiene un efecto tóxico que se presenta como una susceptibilidad a la apoptosis inducida por estaurosporina [80, 81]. Estos trabajos contrastan con la demostrada protección antiapoptótica de la PrP^C en cultivos celulares desprovistos de suero, sin embargo este efecto contradictorio podría explicarse:

- La sobreexpresión de la PrP^C podría interferir en la síntesis de otras proteínas debido a la saturación de la maquinaria de síntesis proteica[58].
- La sobreexpresión de la PrP^C podría dar lugar a la formación de PrP^C tóxicas[82].
- El efecto de la PrP^C pudiera ser diferente según el tipo celular.
- La PrP^C podría dar lugar a formas tóxicas mediante lisis proteica mediada por la caspasa 3 [83], puesto que, al igual que Bcl-2, la PrP^C posee un lugar para la actuación de la caspasa 3.

La acumulación de PrP^{C} en el citoplasma podría ser consecuencia del fallo de los mecanismos de eliminación de las proteínas que ocurre con la edad. Para probar si este acúmulo era tóxico en neuronas, Roucou y colaboradores [84] inhibieron el proteosoma en cultivos celulares neuronales que expresaban los niveles normales de PrP, acumulándose así esta proteína en el citoplasma. Observaron que, lejos de ser neurotóxica, la acumulación protegía a las células frente a la apoptosis inducida por Bax. Finalmente, concluyeron que la acumulación de PrP^{C} en el citoplasma de las neuronas no es suficiente para causar neurotoxicidad.

Además de su efecto directo en las neuronas, la acumulación de PrP^{Sc} puede participar indirectamente en la degeneración mediante la inducción de la gliosis reactiva, en la cual la presencia de PrP^{Sc} induce la secreción por parte de la glía de algunas citoquinas y mediadores inflamatorios que acaban participando en la patogénesis de estas enfermedades [85-87]. También podría actuar mediante la pérdida de sinapsis, ya que a pesar de que la relación causal entre el depósito anómalo de PrP^{Sc} , la pérdida de proteínas sinápticas y la pérdida de sinapsis no está tan clara [88-90], algunos trabajos han destacado la pérdida de sinapsis como un hecho inicial en las enfermedades priónicas [91, 92].

2.2 Scrapie

El scrapie es la primera TSE reconocida en los mamíferos y constituye el prototipo de estas patologías. Esta enfermedad afecta de forma natural a ovejas y cabras y fue descrita por primera vez en 1732 en el Reino Unido [93]. A pesar de haber sido una enfermedad endémica en muchos países, fue a partir de la epidemia en la década de los años 80 de BSE o «enfermedad de las vacas locas» y su posible origen en piensos contaminados con restos de animales infectados con scrapie, cuando se renovó el interés por la enfermedad en su forma natural. En la actualidad ha sido descrita en casi todos los países del mundo, únicamente Nueva Zelanda parece estar libre de la enfermedad.

2.2.1 Características clínicas del scrapie

El período de incubación de scrapie varía entre 14 y 22 meses y la mayoría de los casos clínicos se presentan en animales adultos entre los 2 y los 5 años de edad. Las ovejas afectadas pueden vivir entre 1 y 6 meses tras la aparición de los síntomas clínicos, y el desenlace siempre es la muerte del animal. La sintomatología puede variar ampliamente entre los animales enfermos, posiblemente debido a que se vean afectadas diferentes regiones cerebrales.

Los primeros síntomas en aparecer incluyen cambios en el comportamiento y en el temperamento, los animales se presentan nerviosos, asustados o agitados, presentando a veces un carácter poco gregario y difícil manejo. Aparecen alteraciones locomotoras (ataxia cerebelosa) presentándose sobre todo en las extremidades posteriores. Las alteraciones sensoriales provocan rechinar de dientes, nerviosismo y prurito, que provoca en el animal tienda a rascarse y frotarse contra superficies dando lugar a la pérdida de lana y a la aparición de lesiones en la piel, sobre todo en la zona lumbar. Otros signos son posturas anormales, hiperestesia, temblores musculares, nistagmo y depresión. En estados más avanzados se observa pérdida de peso, ataxia severa, parálisis con incapacidad para incorporarse y, finalmente, la muerte del animal [94].

Las enfermedades con las que comúnmente se puede confundir el scrapie son las siguientes:

- Enfermedades bacterianas: La listeriosis, que produce signos nerviosos similares al scrapie en animales adultos, aunque suele cursar con parálisis facial unilateral, los abscesos también pueden cursar con una clínica con depresión y signos generales, aunque producen fiebre, la encefalomalacia simétrica focal producida por *Clostridium perfringens* tipo D afecta a animales adultos e igualmente cursa con signos nerviosos.
- Enfermedades víricas: El Visna-Maedi es una lenta y progresiva que afecta a animales adultos y por sus síntomas puede ser confundida con scrapie, ya que cursa con signos generales de emaciación, debilitamiento y signos neuronales y motores, el *Louping-ill* o encefalomiелitis cursa con signos neurológicos y motores precedidos por fiebre y adelgazamiento, la rabia provoca la alteración del comportamiento y su curso es agudo, la enfermedad de Aujeszky, en la que los animales suelen morir en unos 24-48 horas con signos neurales y prurito, y la

enfermedad de Borna, que provoca cambios en el comportamiento y signos neurológicos.

- Problemas nutricionales: La poliencefalomalacia, producida por carencia de vitamina B1, puede aparecer con signos nerviosos y motores, al igual que la deficiencia en cobre.
- Desórdenes metabólicos: Pueden causar signos similares al scrapie problemas como la hipocalcemia, hipomagnesemia o toxemia de gestación.
- Parasitarias: Se necesita realizar un diagnóstico diferencial ante enfermedades como la cenurosis, oestrosis, toxoplasmosis o la infestación por *Parelaphostrongylus tenuis*.
- Intoxicaciones: Causadas por *Clostridium tetani* como es el caso del tétanos, intoxicaciones por plomo, alcaloides o por ingestión de *Lolium perenne* o *Phalaris brachystasys*, que cursan con signos nerviosos y pueden ser confundidas con una TSE.
- Traumatismos que afectan al SNC: No se trata de una causa común en el ganado ovino, pero pueden darse de forma aislada en algunos animales.
- Tumores en el SNC
- Enfermedades extraneurales: Las ectoparasitosis, como las pediculosis o sarnas, pueden producir rascado o signos nerviosos, y las garrapatas pueden transmitir *Louping-ill*.

2.2.2 Diagnóstico de scrapie

Diagnostico clínico: Se basa en una serie de criterios definidos en el marco del proyecto europeo FAIRPL98 7021 en el que un grupo de diferentes países, entre ellos España, aportaron sus experiencias con la finalidad de homogeneizar la caracterización de los diferentes síntomas observados. Los criterios generales para la detección clínica de scrapie en ganado ovino y caprino son:

- Afecta a muy pocos animales del rebaño y, habitualmente, la aparición de casos es simultánea. Los casos suelen ocurrir en forma de focos epidémicos, sobre todo si la enfermedad aparece por primera vez en un rebaño con muchos animales con

genotipo sensible o se ha producido de forma iatrogénica, mediante vacunaciones o medicamentos.

- El desarrollo de los signos es gradual, en la mayoría de casos aparecen de forma insidiosa y progresan durante unos meses. También se pueden desarrollar como un brote agudo y normalmente se trata en los rebaños en los que, por falta de seguimiento individual, no se ha informado de ningún caso previo. En esta situación los signos de la enfermedad se acentúan en situaciones estresantes, enfermedades concomitantes o en el manejo rutinario.
- Normalmente se aprecia ausencia de respuesta al tratamiento sintomático, que no es efectivo para paliar los síntomas clínicos previamente descritos.

Diagnóstico histopatológico: Las principales alteraciones que se pueden apreciar en el SNC son: vacuolización neuronal y del neuropilo, degeneración neuronal y gliosis, generalmente localizándose zonas concretas del SNC, como son la médula oblongada, puente, mesencéfalo y tálamo [95, 96]. Cabe señalar que no todas las razas ovinas exhiben la misma intensidad lesional, además de que algunas ovejas afectadas pueden presentar únicamente vacuolización [97]. Si bien este método presenta ciertas restricciones, como en el caso de cerebros que han sido congelados, o presentan un alto grado de autólisis y requiere de confirmación por medios inmunohistoquímicos.

Diagnóstico inmunohistoquímico: La técnica inmunohistoquímica es un procedimiento muy eficaz y sensible para la confirmación de scrapie. [98, 99] La primera técnica se desarrolló empleando modelos murinos y utilizó un anticuerpo específico anti PrP^{Sc} mostrando la detección de placas de amiloide [100], pero estas placas en la enfermedad de scrapie no son comunes. Se trata de un método que se puede emplear en tejidos extraneurales, tanto en animales clínicos como preclínicos, siendo muy relevante éste último caso, permitiendo detectar PrP^{Sc} en tonsilas [101] y tejido linfoide la membrana nictitante de animales preclínicos [102-104]. A pesar de que en la actualidad existen anticuerpos con capacidad de diferenciar PrP^C de PrP^{Sc}, si se quiere detectar únicamente PrP^{Sc} el tejido se trata con proteinasas para asegurar la fiabilidad de la técnica.

Detección de las Fibrillas Asociadas a Scrapie (SAF): Las SAF son estructuras específicas de la enfermedad de scrapie. Se trata de la forma fibrilar de la PrP^{Sc} y se detectó por primera vez mediante microscopía electrónica de transmisión en cerebros de ratones y hámster infectados experimentalmente [105]. Presenta la ventaja de que estas

fibrillas son altamente resistentes a proteasas y pueden ser detectadas en cerebros muy autolíticos [106].

Diagnóstico mediante *Western Blotting*: permite detectar la proteína patológica en función de su resistencia a proteasas, su peso molecular y su reacción frente a determinados anticuerpos. Se realiza mediante la aplicación de una electroforesis en gel de poliacrilamida [107] seguida de un *Western Immunoblotting* [108]. Estas técnicas permiten separar los constituyentes de la PrP^{Sc} en función del peso molecular de las diferentes formas (no glicosiladas, mono-glicosiladas y di-glicosiladas), y posteriormente ser incubados con un anticuerpo anti-PrP.

Técnicas rápidas de diagnóstico: Surgieron como respuesta a la necesidad de técnicas rápidas y fiables para detectar a los animales enfermos por BSE a causa de la epidemia en Reino Unido y posteriormente en diferentes países europeos. Las técnicas aplicadas son el **ELISA** (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) de quimioluminiscencia; el ELISA-sandwich, que emplea la desnaturalización y concentración de la muestra previa incubación con anticuerpo primario y secundario, y la técnica de Western Blotting tradicional modificada, permitiendo acortar tiempos y aumentar el número de muestras y usando el anticuerpo monoclonal 6H4. Se está estudiando la capacidad de las técnicas de Western Blotting modificadas para la detección de animales preclínicos [109], especialmente a partir de muestras de tejido linfático periférico en el ganado ovino y caprino [110].

Pruebas *in vivo*: emplean fluidos tejidos accesibles en los animales permiten detectar a los individuos enfermos antes de su sacrificio. Se ha estudiado la detección mediante la técnica de la inmunohistoquímica a partir de tejido linfático, como se ha señalado anteriormente, empleando principalmente muestras de tonsilas, membrana nictitante y también placenta [111]. A partir de sangre se ha detectado mediante sonicación la transformación de PrP^C en PrP^{Sc} debido a pequeñas cantidades de PrP^{Sc} presentes en la sangre de los animales afectados [112]. Empleando la orina se ha llegado a detectar PrP^{Sc} en animales presintomáticos mediante Western Blotting [113], sin embargo, estos resultados no han sido concluyentes, ya que el patrón de inmunodetección se altera cuando aparecen los signos clínicos y esta actualmente siendo objeto de estudio [114].

2.2.3 Aislados priónicos asociados a la enfermedad de scrapie

La identificación de los diferentes aislados priónicos asociados a la enfermedad de scrapie, que algunos autores denominan cepas, productores de una encefalopatía espongiforme ha sido, y sigue siendo, uno de los retos de la investigación de las enfermedades priónicas. Pattinson y colaboradores en 1961 fueron los primeros en observar que existían diferentes cepas productoras de la misma enfermedad, concretamente en la especie caprina observaron dos síndromes clínicos, uno que se denominó *drowsy* (somnoliento) y otro *scratching* (rascado vigoroso). Durante la década de los noventa, los estudios de tipificación estuvieron basados en las características de incubación, síntomas clínicos y perfiles lesionales que las cepas producían en ratones inoculados experimentalmente. Posteriormente, con los avances en biología molecular, se trató de diferenciar las cepas mediante sus diferencias en los patrones de glicosilación.

Se han aislado más de 20 cepas productoras de scrapie en la especie ovina y caprina [116-118]. El mejor método para separar combinaciones de cepas y para aislar o seleccionar nuevas cepas mutantes consiste en realizar sucesivos pases en una especie diferente a la del aislamiento primario (especie barrera) [119, 120]. Algunos aislamientos son, en realidad, un conjunto de cepas, como por ejemplo el *scrapie sheep brain pool* (SSBP/1), del cual se han aislado las cepas 22A, 22C y 22L. Algunas cepas aisladas en la especie ovina no son transmisibles a ratones, como la cepa CH1641 [123], aunque la mayoría si lo son, dividiéndose en dos grupos en función de las propiedades del gen «*sinc*» del ratón receptor.

El grupo de agentes ME7 exhiben un periodo de incubación corto cuando se hacen los pases en ratones s7, y un periodo largo cuando son ratones p7. La cepa 22A exhibe exactamente características contrarias, largo periodo en s7 y corto en p7 [124, 125].

Las diversas cepas productoras de scrapie son responsables de ciertas características específicas en cuanto al periodo de incubación, perfil lesional y presencia o depósito de PRP^{Sc}. Se han definido tres clases de estabilidad de cepas [126]:

- Cepas de clase 1 (ME7 y 22C) poseen características estables independientemente del genotipo del gen *sinc* del hospedador.

- Las cepas de clases II (22A y 22F) son estables si el pase se realiza en ratones con el genotipo del gen *sinc* idéntico al del hospedador donde se aisló, pero cambian si se pasan en otros genotipos de ratón.
- Las cepas de clase III (31A, 51C, 87A, 125A, 138A, 153A) muestran cambios constantemente, independientemente del genotipo del hospedador. Estas seis cepas se caracterizan por periodos de incubación parecidos, producción de numerosos depósitos amiloides [127] y vacuolización asimétrica. Podría tratarse de una única cepa de scrapie.

También se pueden diferenciar las cepas mediante los patrones lesionales que producen, teniendo este método la ventaja de no depender de la dosis de inóculo utilizada, y que permite conocer qué cepa causó la muerte del animal en caso de competencia entre dos o más cepas [97, 131]. Se han llevado a cabo estudios de los patrones lesionales en el ganado ovino, estos métodos de identificación han descrito diferentes tipos de lesiones según la raza y edad del ovino afectado, la dosis y vía de inoculación y las cepas de scrapie. El empleo de animales ovinos de experimentación tiene limitaciones debido al tiempo requerido hasta que se pueden identificar los síntomas y se puede determinar la cepa.

Las técnicas actuales se basan en los patrones revelados mediante inmunohistoquímica para los depósitos de la proteína prión [132, 133], llegándose a describir más de 12 patrones lesionales según el acúmulo y localización de proteína prión [134]. Los patrones de glicosilación pueden ser detectados mediante la técnica de Western Blotting, pero únicamente con los resultados de la glicosilación no es suficiente para identificar una cepa ya que diferentes cepas pueden poseer el mismo patrón de glicosilación, como ocurre con la cepa CH1641, la BSE y la vCJD [123].

En Noruega, en el año 1998, se describieron los primeros casos de lo que hoy se conoce como «scrapie atípico» o scrapie producido por la cepa Nor98. Esta forma de scrapie difiere del scrapie clásico tanto en el cuadro patológico como en el perfil genético. A diferencia de la forma clásica, apenas hay vacuolización en el obex, ni se encuentran depósitos de PrP^{Sc} en esta zona. En cambio, la mayoría de los animales afectados exhiben vacuolización y acúmulo de PrP^{Sc} en el cerebelo. Además, el patrón obtenido por *Western Blotting* también es diferente, ya que se observa una banda muy pequeña (12 kDa) que no aparece en los casos de scrapie clásico [135].

El scrapie es la patología que parece dar origen a la aparición de la BSE [136, 137]. Como se ha comprobado en los últimos años, la BSE es una zoonosis que afecta a la especie humana [138] dando lugar a la aparición de la vCJD [139]. Recientes estudios demuestran que la BSE puede ser transmitida al ganado caprino y ovino [140], revelando que en modelos murinos la susceptibilidad a la infección por BSE es mayor en los inóculos que han sufrido pasajes por ovino frente a la BSE clásica [141]. Por ello es necesario un modelo que permita la diferenciación de cepas.

2.2.4 Susceptibilidad genética a scrapie

La genética del individuo influye tanto en la susceptibilidad a las enfermedades priónicas naturales, como en el período de incubación de la enfermedad. Una de las primeras evidencias de la influencia genética en esta enfermedad fue descrita en 1964 por Dickinson y colaboradores [142]. Estos investigadores observaron distintos períodos de incubación en una línea de ratones infectados de forma experimental. Posteriormente se han observado distintas mutaciones en el gen que codifica la proteína prión que son las responsables de algunas diferencias observadas en el periodo de incubación y susceptibilidad de la enfermedad.

2.2.4.1 Estructura del gen *PRNP*

El gen de la proteína prión se ha identificado en un gran número de especies de mamíferos, tanto domésticas como salvajes. Es un gen de copia única [31, 32] que se localiza en el cromosoma 20 humano (*PRNP*), en el 2 murino (*Prnp*) y en los cromosomas 13 ovino y bovino. Entre los mamíferos su secuencia se encuentra altamente conservada, por ejemplo el grado de similitud entre la especie bovina y ovina es del 94%. A su vez, estas especies muestran una similitud con el gen humano del 66,7% y del 65,4%, respectivamente. Además, el gen se ha descrito en especies no afectadas por las TSE como aves, reptiles, anfibios y peces [143-147]. En todas las especies estudiadas el gen *PRNP* codifica una proteína de aproximadamente 250 aminoácidos que sufre modificaciones post-traduccionales, hasta convertirse en la proteína madura de unos 210 aminoácidos [148].

Las secuencias del gen *PRNP* ovino y caprino presentan también un alto grado de conservación genética. Tienen un tamaño de 20.000 pb y codifican proteínas PrP con un tamaño de 256 aminoácidos. Tras el procesamiento post-traducciona se obtiene la proteína madura de 210 aminoácidos, con un peso molecular de 33-35 kDa para la forma di-glicosilada [149]. La mayoría de polimorfismos descritos en ovino y caprino se localizan en la parte C-terminal de la proteína PrP, entre los codones 98 y 234 [revisado por 150]. A pesar de la gran similitud, las alteraciones aminoacídicas asociadas con cambios en la susceptibilidad a scrapie parecen ser distintas en las dos especies. Actualmente se acepta la idea de que ambos factores: un genotipo susceptible y la exposición a un agente infeccioso; son requeridos para el desarrollo de la enfermedad [revisado por 151].

2.2.4.2 Susceptibilidad a las formas clásicas de scrapie

Los primeros polimorfismos del gen *PRNP* ovino asociados con susceptibilidad en scrapie experimental y natural se identificaron a principios de los años 90. Tras la secuenciación y posterior comparación del gen de ovejas sanas y enfermas se detectó un polimorfismo en el codón 171, donde se podía encontrar arginina (**R**) o glutamina (**Q**) [152]. Más tarde se identificaron los polimorfismos en los codones 136 de alanina por valina (**A**→ **V**) y 154 de arginina por histidina (**R**→ **H**) [153]. Diversos ensayos revelaron una compleja relación entre los genotipos de PrP en los codones 136 y 171, la cepa del agente infeccioso, y la ruta de exposición [154].

Los alelos V₁₃₆, R₁₅₄, Q₁₇₁ y H₁₇₁ se asociaron a la susceptibilidad y los alelos A₁₃₆, H₁₅₄ y R₁₇₁ se relacionaron con resistencia al padecimiento del scrapie ovino. De las doce posibles combinaciones de estas variantes alélicas, sólo cinco se detectan frecuentemente en la especie ovina: ARR (A₁₃₆R₁₅₄R₁₇₁), ARQ, AHQ, ARH y VRQ. La forma ARR corresponde al genotipo más resistente y la VRQ se relaciona con el más sensible frente al scrapie. Considerando estos cinco haplotipos, puede encontrarse un total de 15 genotipos del gen *PRNP* ovino [155, 156]. La distribución de frecuencias haplotípicas del gen *PRNP* en ovino español muestra que el haplotipo más frecuente es el ARQ [157], siendo este haplotipo también el mayoritario en los animales diagnosticados con scrapie clásico [158]. Este haplotipo es también el más frecuente en las razas mediterráneas [159, 160].

A pesar de la gran cantidad de estudios, se desconoce si las diferencias en la infección son una consecuencia de las diferencias genéticas entre razas o son debidas a la tendencia de las distintas cepas del agente por infectar determinadas poblaciones. Se ha observado que animales del mismo genotipo y raza, en el mismo rebaño, son susceptibles a algunas cepas de scrapie pero resistentes a otras [154, 162, 163].

Por tanto, a pesar de que el gen *PRNP* se puede considerar como un gen mayor que afecta a la susceptibilidad a scrapie, esta base genética no explica la gran variabilidad observada en los tiempos de incubación de los distintos individuos, o en la susceptibilidad, tanto en la especie humana como en ratón y oveja [164-167].

2.2.4.3 Susceptibilidad a otras cepas priónicas

En cuanto a las características genéticas que distinguen al scrapie atípico, se destaca la frecuencia elevada de genotipos con cierta resistencia a scrapie clásico, particularmente el haplotipo AHQ. Además suele aparecer asociado al alelo F (fenilalanina) en el codón 141, que normalmente codifica el aminoácido leucina (L) [168]. También es muy frecuente la asociación de las formas atípicas con genotipos resistentes ARR/ARR o de cierta resistencia como ARR/ARQ, además de los genotipos con AHQ (ARR/AHQ, AHQ/AHQ o AHQ/ARQ) [168-172].

Además de la asociación del genotipo ARR/ARR con la resistencia a la infección natural, también se ha descrito su relación con la resistencia a la inoculación oral con scrapie y BSE en muchas razas ovinas [154, 155, 163, 173-175]. No obstante, han aparecido algunos casos de scrapie clásico portando este genotipo resistente [156, 176]. Además, recientemente se ha demostrado la sensibilidad de animales ARR/ARR a la exposición oral e intracerebral del agente de BSE [177, 178].

Todos estos casos que no se corresponden con los análisis iniciales de genotipado en animales enfermos ponen en duda la relevancia de los programas europeos de selección genética frente a scrapie, ya que todos ellos seleccionan genotipos que son susceptibles al scrapie atípico y pueden serlo también al scrapie clásico [revisado por 151].

2.3 Modelos celulares para el estudio de enfermedades priónicas

Tal y como se ha ido describiendo en los apartados anteriores, aunque en los últimos años el avance en las investigaciones en enfermedades priónicas ha sido muy importante, todavía existen muchas incógnitas con respecto a los mecanismos de replicación del prión o de toxicidad celular, la susceptibilidad genética de los individuos en función de su genotipo para PRNP a padecer la enfermedad dependiendo de las cepas de priones o la naturaleza misma de estas cepas. El estudio de estos aspectos conlleva la utilización de modelos animales, generalmente murinos, que requieren una inversión importante en tiempo y dinero, con el agravante de utilizar especies que no son las susceptibles de forma natural a estas enfermedades. Cuando se utilizan especies susceptibles el tiempo requerido y la inversión es todavía mayor. Por ello se hace necesario el desarrollo de modelos celulares que nos permitan estudiar estos parámetros *in vitro*. Además, estos modelos se pueden utilizar tanto para el estudio de aspectos básicos de la enfermedad [179] como para testar posibles tratamientos [180] o diagnosticar las distintas cepas de scrapie [181].

A pesar de que recientemente se han generado distintos métodos que permiten amplificar o multiplicar el prión *in vitro* sin necesidad de utilizar cultivos celulares, como la PMCA [36, 112], estos métodos libres de células no permiten analizar el efecto de la infección del prión en la célula, ni son muchas veces viables en laboratorios de diagnóstico.

En 1970 se consiguió la infección de cultivos neuronales por el agente de scrapie [182]. Sin embargo, desde entonces, sólo unas pocas líneas celulares han podido ser infectadas por priones y mostrar acumulación de PrP^{res} y/o infectividad, la mayoría de las líneas celulares utilizadas son de origen murino. A continuación se describen los distintos modelos celulares empleados hasta el momento.

2.3.1. Líneas celulares murinas

Los primeros estudios se centraron en líneas de origen neuronal como son las líneas celulares de neuroblastoma [183, 184] o células de Schwann [185] o la línea derivada de cerebro de ratón SMB [186]. Estas líneas celulares muestran infección persistente [183, 187] y se han empleado para estudiar los mecanismos de generación y

tráfico de la PrP^{Sc} [181, 188], y evaluar el potencial terapéutico de diferentes agentes [189, 190].

Los modelos celulares murinos presentan varios problemas que Solassol y colaboradores [191] resumen en:

- Limitada susceptibilidad a ciertas cepas de prión debido a la barrera de especie.
- Únicamente algunas células del cultivo se infectan.
- Es necesario un nivel adecuado de PrP para que exista infección.
- La propagación de priones induce cambios muy sutiles en el fenotipo de los cultivos infectados.

Existen modelos en los que se ha conseguido propagar el prión a pesar de la barrera de especie existente entre el cultivo y el inóculo. Estas líneas celulares generalmente son también de origen murino y propagan únicamente las cepas priónicas que han sido adaptadas experimentalmente a la infección en roedores [191]. Las dificultades encontradas en los modelos murinos se han intentado subsanar creando líneas celulares que expresen una PrP homóloga a la del inóculo [192]. La creación de ratones transgénicos que expresan la PrP ovina, bovina o humana ha facilitado la creación de líneas celulares portadoras de PrP homólogas al inóculo [193, 194]. Sin embargo, la creación de animales transgénicos es un método caro, laborioso y de larga duración. Además, en especies como la ovina, en la que las variantes genéticas tienen mucha influencia en la susceptibilidad de los individuos a las distintas cepas de scrapie [135, 195], esta metodología supondría la construcción de tantos ratones como haplotipos descritos para el gen *PRNP* ovino.

2.3.2. Cultivos neuronales primarios

La obtención de células para este tipo de cultivos se realiza a partir de muestras de SNC de animales y requiere el sacrificio de los mismos. La infección de estos cultivos obtenidos a partir de neuronas de embriones o ratones y ratas neonatos han demostrado ser un modelo de gran valor para el estudio de la patogénesis de virus neurotrópicos, en particular para distinguir las lesiones causadas por el agente infeccioso o por la respuesta del huésped [196].

A diferencia de las líneas celulares murinas donde no se detecta un efecto citopatológico ligado a la propagación del agente infeccioso de las TSE a pesar de la infección persistente [185], en células neuronales infectadas se ha podido observar como la infección tanto de neuronas como de astrocitos condujo a una pérdida neuronal progresiva tras la propagación activa del prion [197]. También ha permitido demostrar que los cultivos neuronales son más sensibles al estrés oxidativo [198], posiblemente ligado a la modificación de las funciones fisiológicas de la PrP^C. Sin embargo, estos modelos están desarrollados en la especie murina y requieren de una adaptación previa del prion por ratón o de la creación de animales transgénicos que expresen la proteína prion celular de la especie origen del prion que sea el objeto de estudio [197], con las posibles variaciones sobre el agente original que ello conlleva. En especies naturalmente susceptibles a la enfermedad, como es la especie humana, este tipo de cultivos son de difícil aplicación ya que requieren el uso de muestras de SNC.

2.3.3. Cultivos de células troncales neuronales

Más recientemente, Milhavet y colaboradores [199] propusieron el uso de células troncales neuronales (NSC) para la propagación *in vitro* del prion. Estas células pueden diferenciarse a distintos tipos celulares del SNC [200, 201] y pueden multiplicar la proteína prion a partir de muy poca dosis de homogeneizado de cerebro infectado. Si se utilizan células troncales de la misma especie afectada se podría eliminar el problema de especie. Las NSC en cultivo forman neuroesferas que también han podido ser infectadas con priones [202], y presentan una serie de ventajas como modelos celulares para la propagación del prion [203]: constituyen un cultivo no transformado que se autorrenueva, se puede obtener de cerebro fetal de ratones normales o transgénicos con secuencias de PrP^C de distintos genotipos o especies; y las neuroesferas diferenciadas son más similares a los tipos celulares presentes en el cerebro que las líneas tumorales. A pesar de lo prometedor de estas líneas, existen muy pocos trabajos que muestren el aislamiento de progenitores neuronales de especies de interés en los estudios sobre priones como son los rumiantes [204] o la especie humana. Estas células se obtienen a partir de embriones, con los problemas éticos que ello supone. Las células troncales también están presentes en el SNC adulto [205], principalmente en el hipocampo y la zona ventricular [206], pero también se ha descrito la presencia de estas células en la

médula espinal [207]. La inaccesibilidad de las fuentes de NSC en el cerebro limita severamente la utilidad de las mismas.

2.3.4. Cultivos de células troncales mesenquimales

En los últimos años se han descrito dos bioensayos destinados a la multiplicación de distintas cepas priónicas utilizando células con características mesenquimales obtenidas a partir del estroma de bazo [208] y médula ósea de ratón [209]. En ellos se han conseguido multiplicar con éxito una cepa de la variante de Creutzfeldt-Jakob y otra de Gerstmann-Sträussler-Schneiker adaptadas a ratón.

Para multiplicar el prión no parece necesaria la diferenciación de las MSC a células neurales, de hecho, se ha demostrado que se puede detectar la presencia de PrP^{res} en modelos murinos infectados experimentalmente y que la infección de las MSC *in vivo* podría preceder a la acumulación de PrP^{Sc} en el cerebro [210]. En el mismo estudio se demostró la presencia de PrP patológica en las MSC obtenidas a partir de médula ósea tomadas en autopsias de pacientes fallecidos por CJD [210], proponiéndolo como un método alternativo de diagnóstico precoz de la enfermedad. Estos autores proponen que las MSC de médula ósea expresarían PrP a largo plazo, con lo cual podrían ser un lugar reservorio para los agentes de las TSE y en ese caso las células sanguíneas podrían infectarse al entrar en contacto con las MSC. Sin embargo, existen resultados contradictorios en la bibliografía ya que otro grupo analizó la presencia de infectividad en la médula ósea de pacientes con TSE y obtuvieron resultados negativos [211], por lo que la infectividad de este tejido podría depender del tiempo en el que se tome la muestra en el transcurso de la enfermedad.

En la actualidad, no conocemos ningún trabajo en el que se hayan utilizado MSC adultas de hospedadores naturales como ovino, bovino o humano como modelos de multiplicación de las cepas priónicas que afectan a estas especies *in vitro*. En el presente trabajo nos hemos propuesto analizar el potencial de las células mesenquimales ovinas para multiplicar el prión *in vitro*. El objetivo de estos modelos sería el estudio de la multiplicación del prión, diagnóstico, posible determinación de cepas en función del genotipo para *PRNP* de las células, además del estudio de los mecanismos moleculares de la neuropatología de scrapie en la especie ovina. El desarrollo en ovino, además de

su interés en el campo de Veterinaria, supondría un punto de partida para el desarrollo de modelos celulares humanos, ya que estas células se pueden obtener fácilmente de individuos sanos y/o enfermos.

2.4 Células Mesenquimales

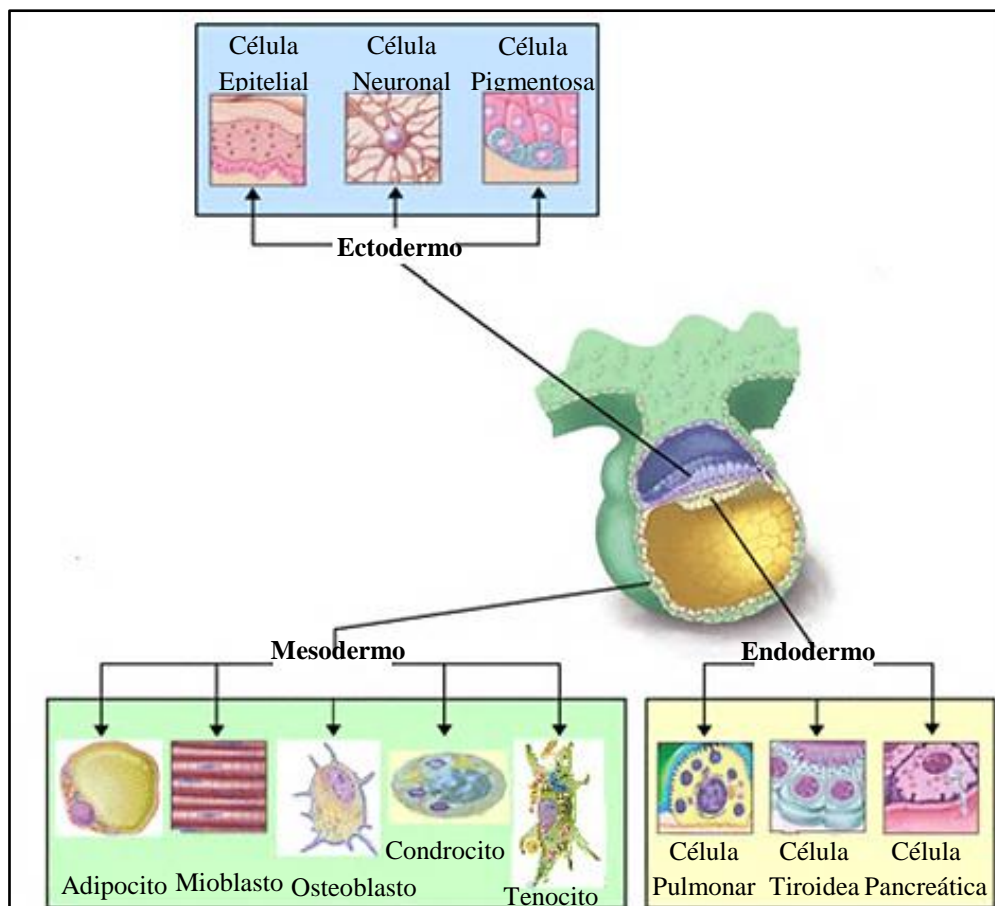
Las MSC son un tipo de células madre adultas que poseen las capacidades de autorrenovación y diferenciación. Se trata de células troncales adultas, es decir, células no diferenciadas, que se encuentran en los tejidos y órganos adultos. Poseen la capacidad de dar lugar a células diferenciadas del tejido en el que residen y a un número limitado de tipos celulares de otros tejidos. Se han aislado células madre adultas de la mayoría de los tejidos, aunque el tejido considerado como la mayor fuente de ellas es la médula ósea. La capacidad de diferenciación de las células madre adultas dependerá del origen embrionario de los mismos (Figura 2).

Las MSC son consideradas células troncales multipotenciales ya que son capaces de generar células maduras de su misma capa embrionaria. Al proceder de la capa embrionaria mesodermal, las MSC pueden diferenciarse en los tejidos que derivan de ella: adipocitos, mioblastos, osteoblastos, condrocitos y tenocitos. Estas células troncales son capaces, en ciertas condiciones, de diferenciarse en células que proceden de distinta capa embrionaria como son las células neurales (ectodermo) [214] y las células hepáticas (endodermo) [215], capacidad que se conoce como plasticidad.

En 1970 se describieron por primera vez células aisladas a partir de médula ósea de ratones y cobayas por A.J. Friedenstein y colaboradores [216]. Estas células que se adherían al plástico y eran capaces de formar colonias con una morfología de fibroblasto, por ello se las denominó **CFU-F** (Colony-Forming Unit like Fibroblast).

Se estudiaron las capacidades de las CFU-F aisladas de la médula ósea respecto a su capacidad de proliferación, autorrenovación y diferenciación a los distintos linajes posibles [217, 218]. En 1991 se desarrollaron los primeros protocolos de aislamiento y expansión [219], además de probar las primeras aplicaciones clínicas [220]. Ya en 2002 se definieron las características básicas de las primeras MSC humanas obtenidas a partir de tejido adiposo [221].

Figura 2. Diagrama de las capas embrionarias y células que derivan de cada una de ellas
(© 2001 T. Winslow, L. Kibiuk).



Existe disconformidad en cuanto a los marcadores de superficie que definen a las MSC frente a otros tipos celulares que son capaces de adherirse al plástico y que pueden encontrarse en algunos tejidos de los que se extraen las MSC. Así, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) determinó en 2006 [222] unos criterios mínimos que debían cumplir las células aisladas a partir de médula ósea humana para poder ser consideradas MSC:

- Capacidad de adherencia al plástico en condiciones estándares de cultivo.
- Expresión de ciertos marcadores de superficie analizados mediante citometría de flujo: más de un 95% de *CD105* (endoglina), *CD73* (5' nucleotidasa) y *CD90* (Thy-1); y menos de un 2% de *CD45* (proteína tirosina fosfatasa), *CD34* (marcador de células precursoras hematopoyéticas), *CD14* o *CD11b*, *CD79α* o *CD19* y *HLA-DR*.
- Ser capaces de diferenciarse a osteoblasto, adipocito y condrocito *in vitro*.

Estos criterios son generalmente válidos para definir las MSC de otras especies [223] aunque el criterio de los antígenos de superficie es, en ocasiones, difícil de determinar en alguna de ellas debido a la falta de especificidad de los anticuerpos comerciales [224].

2.4.1 Fuentes de obtención de MSC

Hasta la actualidad se han conseguido aislar MSC de numerosos tejidos adultos como son la sangre periférica [225], pulmón [226], músculo [227], líquido sinovial [228], hueso, cartílago, tendón [229], el tejido vascular [230] y la pulpa dental [231]. En la presente memoria del máster nos centramos en la obtención y caracterización de MSC obtenidas a partir de sangre periférica de ovino y médula ósea, ya que la sangre periférica es de fácil acceso y la médula ósea, como se ha dicho anteriormente, se considera la principal fuente de MSC en el animal adulto.

Existen trabajos previos que describen el aislamiento de MSC ovinas a partir de médula ósea [232, 233] o tejido adiposo [234]. Sin embargo, hasta el momento no conocemos ningún estudio con MSC ovinas obtenidas de sangre periférica. El desarrollo de protocolos que nos permitan aislar este tipo de células facilitaría la creación de un banco de MSC ovinas procedentes de animales con distintas susceptibilidades al padecimiento de la enfermedad, en función de su genotipo para *PRNP*, ya que se podrían realizar toma de muestras en animales de campo, y podrían servir para monitorizar posibles efectos de la enfermedad en las características de estas células en animales con scrapie.

2.4.2 Caracterización

Antes de su uso en investigación o en terapia, las MSC requieren ser caracterizadas para asegurar la naturaleza de los cultivos. Para caracterizar las MSC se estudian una serie de parámetros relacionados con sus diferentes capacidades en cuanto a proliferación, expresión de marcadores de superficie y diferenciación a los linajes mesenquimales. En la especie ovina, alguno de estos parámetros se ha estudiado en MSC procedentes de médula ósea y tejido adiposo. En este trabajo de máster

caracterizaremos por primera vez las MSC obtenidas a partir de sangre periférica comparándolas con las de médula ósea.

2.4.2.1 Capacidad de proliferación

Las MSC son un interesante modelo de estudio debido a la facilidad para establecer cultivos *in vitro* y realizar ensayos de proliferación con ellas [235]. Estas células son capaces de expandirse en cultivo a un ritmo entre 20 y 50 doblajes en 10 semanas [236]. En el caso de la especie humana, el tiempo de doblaje normal para las MSC es de unos 4 días en los primeros pases, que se reduce a medida que van avanzando [237]. Para otras especies se observan tasas de crecimiento diferentes al de las células humanas [238]. En la especie ovina se ha descrito una gran variabilidad en la proliferación de las MSC obtenidas de médula ósea [239].

2.4.2.2 Fenotipo

El reconocimiento e identificación de las MSC por su fenotipo específico en cuanto a la expresión de marcadores de superficie celular es importante para poder distinguirlas de otros tipos celulares que las acompañan y puedan contaminar el cultivo. No existe un marcador inequívoco para las MSC aisladas de diferentes tejidos de origen [240]. Por ello, la forma de caracterizarlas es mediante la búsqueda combinada de la presencia de ciertos antígenos de superficie y la ausencia de otros característicos de las células hematopoyéticas o endoteliales (Tabla 1).

La expresión de estos marcadores puede variar a lo largo del cultivo *in vitro* debido al enriquecimiento y homogeneización del mismo [237]. También puede variar según el tejido de origen [241]. En el caso de *CD34* se ha visto que no presenta expresión en las células procedentes de la médula ósea, pero sí de forma leve en las de tejido adiposo [241]. Al contrario, con *CD106* se detecta expresión en células procedentes de médula ósea pero no en las obtenidas de grasa [242]. En la especie ovina existen pocos trabajos que analicen el fenotipo para las MSC, sin embargo, en los últimos años se ha descrito la correspondencia entre los marcadores empleados en la especie humana y su empleo para caracterizar las MSC ovinas [243].

Tabla 1. Marcadores de superficie analizados en MSC humanas de médula ósea. Adaptado de [244].

Tipo de marcador	Antígeno	Detección
SH2 y SH3	CD73	Positiva
Endoglina	CD105	Positiva
STRO-1		Positiva
ALCAM	CD166	Positiva
VLA- α 1	CD49a	Positiva
VLA- α 2	CD49b	Positiva
VLA- α 3	CD49c	Positiva
VLA- α 4	CD49d	Negativa
VLA- α 5	CD49e	Positiva
VLA- α 6	CD49f	Positiva
Cadherina 5	CD144	Negativa
PECAM-1	CD31	Negativa
ICAM-1	CD54	Positiva
ICAM-2	CD102	Positiva
ICAM-3	CD50	Positiva
HCAM	CD44	Positiva
VCAM	CD106	Positiva
NCAM	CD56	Negativa
Cadena LFA- α 1	CD11a	Negativa
Cadena LFA- β 1	CD18	Negativa
Cadena CR4 α	CD11c	Negativa
Mac 1	CD11b	Negativa
Antígeno células precursoras hematopoyéticas	CD34	Negativa
Proteína tirosina fosfatasa	CD45	Negativa
Thy-1	CD90	Positiva
MUC18	CD146	Positiva
ITGB1	CD29	Positiva
ANPEP	CD13	Positiva
MHC-I		Positiva
MHC-II		Negativa

2.4.2.3 Potencial de diferenciación

Las MSC derivan de la capa mesodermal del embrión por lo que poseen el potencial de diferenciación a osteoblasto, adipocito, condrocito, tenocito y mioblasto. En sus nichos, las MSC permanecen quiescentes en un estado G0/G1 del ciclo celular a la espera de un estímulo externo que les indique que deben comenzar a proliferar y diferenciarse posteriormente [240]. Es posible conseguir la diferenciación de las MSC a los tipos celulares derivados del mesodermo *in vitro* mediante la adición de medios de cultivo específicos con los inductores adecuados.

Se ha visto que las MSC ovinas poseen gran variabilidad en su potencial de diferenciación en las diferentes líneas celulares durante la condrogénesis [243] y en la expresión de marcadores neuronales [245].

Diferenciación adipogénica

Para que las MSC entren en diferenciación adipogénica, se emplean normalmente inductores relacionados con ligandos de receptores de hormonas asociados con la adipogénesis, como son la dexametasona (ligando del receptor de glucocorticoides) o el factor de transcripción de receptores activados de proliferación de los peroxisomas (**PPAR γ**). Estos inductores producen en las células alteraciones en la transcripción génica que conllevan un aumento de la expresión de factores de transcripción como PPAR γ o el **C/EBP α** (proteína ligante a CCAAT). Estos factores de transcripción desencadenan a su vez la activación de genes relacionados con la adipogénesis como **aP2** (proteína de unión específica a ácidos grasos), **LPL** (lipoprotein lipasa), **GLUT4** (transportador de glucosa tipo 4), perilipina (**PLIN1**), adiponectina (**ADIPOQ**) y adiposina (**CFD**) entre otros. Los genes de los factores de transcripción mencionados junto con **LPL** se consideran marcadores de diferenciación temprana ya que se regulan positivamente durante las primeras etapas, mientras que el resto son marcadores de diferenciación tardíos [246].

La activación y expresión de estos genes provoca un cambio morfológico en las células que podemos apreciar al microscopio: la célula madre mesenquimal cambia su forma típica de fibroblasto por una más redondeada, que acumula paulatinamente gotas lipídicas. Estas gotas lipídicas aumentan su tamaño a medida que acumulan más grasa. En ovino se ha descrito la diferenciación a este linaje celular a partir de MSC obtenidas de médula ósea [243] y sangre de cordón umbilical [247].

Diferenciación osteogénica

La osteogénesis y la adipogénesis son procesos íntimamente relacionados ya que si se produce uno de ellos, se mantiene inhibido el otro debido a la implicación de PPAR γ [248]. Los reactivos añadidos a los medios para inducir la osteogénesis son sustancias que promueven la mineralización y modulan las actividades osteoblásticas [249]. El ascorbato, por ejemplo, aumenta la expresión de la fosfatasa alcalina (marcador intermedio de diferenciación) y de la osteocalcina (**OC** o **BGLAP**). Además, el ascorbato está relacionado con la conversión de residuos de prolina en hidroxiprolina en las moléculas de colágeno [250].

Al poner en contacto a las MSC con los inductores de diferenciación osteogénica se producen una serie de cambios genéticos y una remodelación de la matriz extracelular. El marcador de osteogénesis es el factor de transcripción Runx-2 (marcador temprano de diferenciación) que promueve la expresión de genes como la *BGLAP*, osteopontina (*SPPI*) y la síntesis de colágeno tipo I (*COL1A1*). El cambio apreciable mediante un microscopio óptico, se observa la formación de nódulos en los que se produce un depósito de hidroxiapatita.

Las MSC ovinas obtenidas de tejido adiposo y médula ósea presentan esta capacidad de diferenciación a tejido óseo [234]. De hecho, el ovino es un animal modelo ampliamente utilizado para el estudio de la aplicación de terapia celular en el tratamiento de lesiones del aparato locomotor [251-253]

Diferenciación condrogénica

La diferenciación condrogénica de las MSC se induce mediante moléculas como el factor de crecimiento transformante beta 3 (**TGF- β 3**) y la proteína morfogenética del hueso 2 (**BMP2**), cuando éstas se encuentran en cultivo en pellet ya que un entorno tridimensional junto con una situación de hipoxia favorecen esta diferenciación [254]. También se ha descrito la diferenciación condrogénica en cultivos en monocapa [247]. Durante la diferenciación se produce un aumento de la expresión de los factores de transcripción de la familia Sox (el desencadenante principal es Sox9) y Scleraxis y además de genes como el agrecano, el colágeno tipo II (*COL2A1*) y el *COMP* (proteína oligomérica de la matriz del cartílago). Estos genes constituirán las principales proteínas

de la matriz extracelular del cartílago [255]. Para observar la diferenciación a nivel microscópico es necesario realizar la tinción de los glucosaminoglicanos presentes en él [256]. Se ha descrito en ovino que *TGF- β 3* induce la diferenciación condrogénica [243], además se ha utilizado la inoculación de MSC prediferenciadas a condrocito como tratamiento en modelos ovinos de lesiones articulares [252].

2.4.3 Plasticidad de las MSC

Las MSC colaboran en procesos de regeneración axonal [257], expresando marcadores neuronales y presentando un efecto antiinflamatorio [258]. Además de estos efectos sobre lesiones en el SNC que parecen indicar cierta capacidad de diferenciación hacia líneas neuronales, las MSC también se han podido diferenciar a elementos neuronales *in vitro* [259-262]. De hecho, la plasticidad de las células troncales es más extensa de lo que se creía en un principio. La capacidad de diferenciación de las MSC adultas a células del SNC las convierte en modelos celulares candidatos al estudio de las enfermedades priónicas, con la ventaja añadida de la facilidad de obtención de las MSC a partir de médula ósea o sangre periférica de individuos adultos, evitando la necesidad de tener que recurrir al asilamiento de células troncales neuronales a partir de tejidos embrionarios.

Para la diferenciación *in vitro* se han empleado medios enriquecidos con mercaptoethanol, alfa-MEM o ácido retinoico y medios con dimetilsulfóxido (**DMSO**) junto a beta-hidroxianisol (**BHA**). Estos factores inducen cambios en las MSC y se vuelven inmunorreactivas al Antígeno Nuclear Neuronal (**NEUN**), la Enolasa Específica de Neurona (**NSE**), Nestina (**NES**) y la Proteína ácida Fibrilar (**GFAP**). Además de estos marcadores, estudiando sus capacidades electrofísicas se ha visto que expresan dos rectificadores tardíos de canales de K^+ (eag1 y eag2), los cuales son fundamentales para restaurar el potencial negativo requerido por la neurona para ejercer su actividad [263].

También se observan cambios morfológicos en los cultivos diferenciados como la retracción del citoplasma, cuerpos celulares esféricos, protrusiones celulares y una detención de la proliferación. Las células se muestran al microscopio con elongaciones ordenadas en dos o tres polos y con formaciones ramificadas en sus extremos [258].

Hasta el momento, no existen referencias en las que se haya estudiado la capacidad de las MSC ovinas a diferenciarse hacia células neuronales. Este es uno de los objetivos que nos hemos planteado en el Trabajo Fin de Máster. Tal y como hemos señalado, esta propiedad hace más atractivas a las MSC para el estudio de enfermedades priónicas ya que podrían establecerse modelos para el análisis de la toxicidad de la proteína prión.

3 OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El objetivo final del presente trabajo es estudiar el potencial de las MSC ovinas extraídas de médula ósea y sangre periférica para el desarrollo de modelos *in vitro* para el estudio de scrapie y otras enfermedades priónicas. Para el logro de esta meta nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

- Aislamiento y caracterización de las células mesenquimales ovinas procedentes de médula ósea y sangre periférica.
- Determinar el potencial de diferenciación a células del sistema nervioso central de las células mesenquimales ovinas de ambos orígenes.
- Evaluar la expresión de la proteína prión celular, tanto en células diferenciadas como indiferenciadas.
- Analizar la susceptibilidad de las células mesenquimales ovinas a la infección por aislados priónicos de scrapie clásico y la capacidad de mantenimiento de dicha infección.

4 METODOLOGÍA

En este apartado se detallan los materiales y métodos empleados para el Trabajo de Fin de Máster. Se hará una descripción de cada uno de ellos a la vez que se indicará con qué objetivo concreto fueron realizados.

4.1 Cultivo de MSC

Para el desarrollo de este trabajo se llevaron a cabo técnicas de cultivo celular. El manejo de las células se realizó en condiciones de esterilidad haciendo uso de una cabina de flujo laminar y en laboratorio de bioseguridad P3 del Centro de Investigación de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes si era necesario por las características de las células o los inóculos utilizados así lo requirieron. A continuación se explican brevemente los diferentes pasos requeridos para el cultivo celular.

4.1.1 Obtención de muestras y aislamiento de MSC ovinas

Se obtuvieron muestras a partir de ovinos procedentes del rebaño experimental del centro citado, cuyos animales proceden de rebaños regionales afectados por la enfermedad de scrapie. Los animales específicos y las muestras biológicas a partir de las que se aislaron las MSC y la metodología utilizada para el procesado de las mismas se describen a continuación

- **Animales:** Durante la realización de este trabajo se han obtenido muestras biológicas de un total de 11 ovejas. Todas ellas eran hembras con edades comprendidas entre 1 y 6 años, de raza Rasa Aragonesa y distintos genotipos para el gen *PRNP*. El uso y toma de muestras de estos animales fue aprobado por la comisión ética de la Universidad de Zaragoza (PI38/10). Se obtuvo médula ósea de 5 animales y la sangre periférica se extrajo de 6 animales.
- **Aspirados de médula ósea de cabeza humeral:** Las intervenciones se realizaron bajo neuroleptoanalgesia (sedación profunda con xilacina intravenosa y anestesia local en la zona de punción). Para minimizar el sufrimiento y estrés innecesario de los animales, los procedimientos se realizaron en las instalaciones en donde los

animales se encuentran estabulados habitualmente. Cuando la neuroleptoanalgesia surtió efecto, el animal se colocó encima de una mesa móvil en decúbito lateral, en la que se preparó asépticamente la zona de la punción.

El lugar escogido para la extracción de médula ósea fue la cabeza humeral, siendo el lugar de entrada el lado cráneo-lateral del húmero proximal, distal al tubérculo mayor. Se utilizó una aguja de 13G Jamshidi (Care Fusion), por lo que no fue necesaria incisión previa ni sutura posterior. La aguja se introdujo con el estilete montado mediante presión y movimientos de rotación, siguiendo un ligero ángulo caudo-dorsal para introducir la aguja en la medular de la cabeza del húmero. Tras retirar el estilete se conectó una aguja de 10 ml precargada con heparina y se realizó la aspiración. En ningún caso fue necesario revertir la sedación con atipamezol intravenoso.

El aspirado de 15 ml de médula ósea se homogeneizó y las células mononucleares se aislaron por gradiente de centrifugación, utilizando Lymphoprep (Atom), a 1800 r.p.m. sin aceleración ni deceleración. Las células fueron lavadas dos veces con Tampón Fosfato Salino (**PBS**) (Gibco). Para el conteo de células mononucleadas se eliminaron los glóbulos rojos utilizando Red Blood Cell Lysis Buffer (SIGMA) y fueron sembradas a una densidad de 2.000.000 de células mononucleadas/cm².

- **Obtención de sangre procedente de vena yugular:** De un modo similar, los procedimientos también se realizaron en las instalaciones en donde los animales se encuentran estabulados habitualmente para minimizar el sufrimiento y estrés de los animales. En este caso no fue necesaria la anestesia ni sedación, ya que la extracción de sangre es un procedimiento rutinario, y más allá de la punción el procedimiento no es doloroso. El lugar escogido fue la vena yugular, se obtuvieron unos 25 ml de sangre periférica por animal, depositando la muestra sobre tubos heparinizados (Becton Dickinson). La sangre fue diluida en un volumen 1:1 de PBS y posteriormente las células mononucleares se aislaron por gradiente de centrifugación en Lymphoprep (Atom), a 1800 r.p.m. sin aceleración ni deceleración. Las células fueron lavadas con PBS dos veces y sembradas a una densidad de 2.000.000 de células mononucleadas/cm².

Las células de ambos orígenes se mantuvieron en medio de crecimiento, compuesto por DMEM bajo en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) y según su origen, se suplementó con un 10% de suero fetal bovino (**FBS**) (Gibco) (células procedentes de médula ósea), y con un 20% de FBS (células obtenidas a partir de sangre periférica). Después de la extracción, a las 24, 48 y 72 horas, las células se lavaron con PBS y el medio se cambió para eliminar las células no adherentes. Las MSC se mantuvieron en condiciones de 37°C, 5% de CO₂ y 20% de O₂ para todos los procesos realizados.

4.1.2 Expansión y criopreservación de MSC

Para la realización de los experimentos que componen la presente memoria fue necesario trabajar con un número elevado de células, objetivo que se consiguió a través de la expansión de MSC en varios pases.

Las MSC de ambos orígenes se cultivaron realizando cambios de medio dos veces por semana, hasta alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia. Posteriormente, las células se separaron de la superficie de la placa de cultivo por tratamiento con 0,25% tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich) y se contaron empleando la cámara de Neubauer. En este punto, una fracción de células fue sembrada a una densidad de 5.000 MSC/cm², que constituyó un nuevo pase, mientras que el resto de las células fueron criopreservadas para la realización de experimentos posteriores. El medio de congelación en el que las células fueron resuspendidas estaba compuesto por un 90% de FBS y 10% de DMSO. Las células se expandieron hasta pase 3 para las células obtenidas a partir de médula ósea, y hasta pase 2 para las células obtenidas a partir de sangre periférica. Posteriormente todas las células fueron congeladas utilizando el medio de congelación anteriormente descrito y mantenidas a -150°C.

4.1.3 Caracterización de las MSC

Antes de estudiar su posible aplicación como modelos celulares para el estudio de scrapie, fue necesario comprobar que las células aisladas eran MSC. Para ello se

caracterizaron mediante el análisis de su capacidad de proliferación y expresión de los marcadores de superficie e inducción de las MSC hacia los linajes mesodérmicos utilizando diferentes condiciones de cultivo en función de los requerimientos específicos de cada una de ellas. La caracterización en cuanto a potencial de diferenciación ha sido más exhaustiva para las MSC derivadas de sangre periférica ya que este trabajo es el primero que describe el aislamiento de este tipo de células. Así en las PB-MSC se ha analizado la cinética de diferenciaciones mediante marcadores moleculares mientras que en BM-MSC sólo se han estudiado en el punto final.

4.1.3.1 Capacidad de proliferación

La capacidad de proliferación se evaluó estimando los parámetros del doblaje celular (**CD**) y del tiempo de doblaje (**DT**). Para ello se contaron las células tras el aislamiento (pase 0) hasta el pase en que se congelaron todas. Los valores de CD y DT fueron calculados empleando las fórmulas:

$$CD = \ln \frac{N_i}{N_f} \quad DT = \frac{CT}{CD}$$

Siendo *CD* el doblaje celular, *N_i* el número inicial de células, *N_f* el número final de células en los cultivos, *DT* el tiempo de doblaje y *CT* el tiempo de cultivo en días.

4.1.3.2 Expresión de marcadores de superficie

El estudio basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa o en Tiempo Real (**RT-qPCR**) se ha usado para cuantificar los niveles de expresión del ácido ribonucleico mensajero (**mRNA**) para seis genes de antígenos de superficie (véase apartado 4.2). Se han analizado los marcadores mesenquimales *CD29*, *CD73*, *CD90* y *CD105* y los marcadores hematopoyéticos *CD34* y *CD45*.

4.1.3.3 Capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos

Diferenciación adipogénica

Las células mesenquimales provenientes de sangre periférica (**PB-MS**C) y las células mesenquimales provenientes de médula ósea (**BM-MS**C) se sembraron a una densidad de 5.000 MSC/cm² en placas de 24 pocillos y se mantuvieron durante 14 días. Las células control mantenidas en medio de crecimiento y las tratadas con medio adipogénico fueron sembradas por cuadruplicado (sendos duplicados para el medio de crecimiento y el medio de diferenciación). El medio de diferenciación estaba compuesto por medio de crecimiento suplementado con 1 µM de dexametasona, 500 µM de IBMX, 200 µM de indometacina y 15% de suero de conejo [256] y fue renovado dos veces por semana. Los lípidos intracelulares formados en el interior de las MSC diferenciadas fueron visualizados a los días 7 y 14 tras su fijación con formalina al 10% (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos y su tinción con oil red O 0,3% (Sigma-Aldrich), que tiñe de rojo los ácidos grasos. En los días 7 y 14 se estudió la expresión de marcadores adipogénicos *PPAR*γ, esteaoril-CoenzimaA desaturasa (*SCD*), e interleuquina 6 (*IL-6*) mediante RT-qPCR (véase apartado 4.2) en las PB-MS. Estos marcadores se analizaron el último día de cultivo en las BM-MS.

Diferenciación osteogénica

Las células se sembraron a una densidad de 20.000 MSC/cm² en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante 21 días, según protocolos empleados para otras especies [264]. Las células control tratadas con medio de crecimiento y tratadas con medio de diferenciación osteogénica fueron sembradas por cuadruplicado (sendos duplicados para el medio de crecimiento y el medio de diferenciación). El medio de inducción estaba formado por medio de crecimiento suplementado con 10 nM de dexametasona, 10 mM de β-glicerofosfato y 100 µM de ascorbato-2-fosfato y fue renovado dos veces por semana. Para la valoración de la osteogénesis, las células se fijaron con etanol al 70% frío los días 7, 14 y 21 de la diferenciación y se incubaron durante 10 minutos con Alizarín Red 2% (Sigma–Aldrich) y pH 4,6. Esta molécula presenta afinidad por el calcio depositado en la matriz extracelular generada por las células diferenciadas. Además se estudió la expresión de los marcadores osteogénicos

COL1A1 y *BGLAP* los días 7, 14 y 21 de cultivo de las PB-MSC mediante RT-qPCR (véase apartado 4.2) y el día 21 en las BM-MSC.

Diferenciación condrogénica

Para esta diferenciación se utilizaron 100,000 MSC/cm², sembradas en monocapa sobre una placa de 24 pocillos y mantenidas durante 21 días. Las células control tratadas con medio de crecimiento y las tratadas con medio condrogénico fueron sembradas por cuadruplicado (sendos duplicados para el medio de crecimiento y el medio de diferenciación). El medio condrogénico estaba compuesto por DMEM bajo en glucosa (Gibco) suplementado con 10% de FBS, 1,8 ng/ml TGF-β3 (R&D Systems), un 10% de ITS + Universal Culture Supplement Premix (BD), 56 µg/ml de ascorbato-2-fosfato y 0,1 µM de dexametasona [247]. El medio se renovó dos veces por semana. Las células se fijaron los días 14 y 21 con un 10% formalina (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos y teñidas con Alcian blue 1% (Sigma-Aldrich) diluido en ácido clorhídrico 0,1 M a pH final de 1 para revelar los glucosaminoglicanos depositados en la matriz extracelular. A los 14 y 21 días de cultivo se midieron los marcadores biglicano (*BGN*) y lumicán (*LUM*) mediante RT-qPCR (véase apartado 4.2) en las PB-MSC y el día 21 en las BM-MSC.

4.1.4 Capacidad de transdiferenciación neurogénica

Se probó la plasticidad de las MSC induciendo su diferenciación neurogénica. Este potencial se comprobó sembrando las células a una densidad de 2.500 MSC/ cm² para las células de sangre periférica, y de 5.000 MSC/ cm² para las células de médula ósea. Se utilizaron cuadruplicados (sendos duplicados para el medio de crecimiento y el medio de diferenciación) tanto para las células mantenidas en medio de crecimiento como para las tratadas con medio neurogénico. El medio de diferenciación empleado fue el Medio Neurogénico HyClone (Thermo Scientific) que se renovó dos veces por semana. La diferenciación se comprobó mediante la observación directa al microscopio los días 3 y 6, y mediante el análisis por RT-qPCR en ambos tipos celulares (véase apartado 4.2) de los marcadores neurogénicos proteína 2 asociada a microtúbulos (*MAP2*), factor hormonal liberador de hormonas leutinizantes embriónico nasal

(*NELF*), *NES*, polipéptido medio de neurofilamento (*NEFM*), y tubulina beta clase 3 (*TUBB3*). También se analizó la expresión del gen que codifica la proteína prión (*PRNP*).

4.2 Análisis de la expresión génica

Para realizar el análisis de la expresión génica de los distintos marcadores fueron necesarios los procedimientos que a continuación se describen.

4.2.1 Extracción de RNA y síntesis de DNA complementario

La extracción de ácido ribonucleico (**RNA**) y la síntesis de cDNA se realizaron como paso previo al análisis de expresión de los distintos marcadores. La metodología para la extracción y síntesis de cDNA fue la siguiente:

- Para cultivos con más de 500.000 células, las células fueron separadas de los frascos con tripsina, lavadas con PBS, transferidas a tubos de 1,5 ml en alícuotas de 10^6 células, centrifugadas y congeladas a -80°C . La extracción de RNA se llevó a cabo con el *kit* comercial RNA spin mini (GE Healthcare) y la posible contaminación con DNA genómico se eliminó mediante el tratamiento con DNase turbo (Ambion) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La síntesis de cDNA se llevó a cabo con hexámeros aleatorios utilizando el *kit* SuperScript First-Strand Sintesis System (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones de uso. Los extractos de cDNA se diluyeron 1:5 en agua ultrapura para su posterior análisis mediante RT-qPCR.
- Para cultivos sobre placas de 24 pocillos, las células fueron lavadas con PBS y congeladas directamente en las placas de cultivo a -80°C . La extracción de RNA y síntesis de cDNA se realizaron utilizando el *kit* comercial Cell to cDNA II (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los extractos de cDNA se diluyeron 1:5 en agua ultrapura para su posterior análisis mediante RT-qPCR.

4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa

En el desarrollo del Trabajo de Fin de Master, además de la técnica convencional de Reacción en cadena de la polimerasa previa retrotranscripción del RNA a cDNA (**RT-PCR**), también se utilizó la RT-qPCR para obtener datos que nos permitiesen cuantificar la expresión de los transcritos analizados.

La técnica de PCR convencional consiste en la amplificación específica de un fragmento de DNA o cDNA mediante la utilización de un cebador diseñado específicamente para amplificar ese fragmento. Gracias a la adición de iones divalentes y desoxirribonucleótidos (**dNTPs**), el cebador es capaz, tras una serie de repeticiones de ciclos de tiempo y temperatura en un termociclador, de sintetizar una gran cantidad de hebras de DNA. Esta técnica se utilizó para la validación de los cebadores diseñados para los análisis de expresión génica realizados en este trabajo.

La PCR cuantitativa o en tiempo real (RT-qPCR) permitió estudiar y comparar la expresión de marcadores de superficie celular en los cultivos para comprobar su naturaleza, así como comparar la expresión de marcadores antes y después de las diferenciaciones.

La técnica se fundamenta en el uso de fluoróforos que se unen al fragmento amplificado y emiten distinta cantidad de fluorescencia en función del número de copias sintetizadas. El número de copias del fragmento se corresponde en un determinado ciclo, ciclo umbral (*threshold cycle*, Ct), con la cantidad de hebra molde en la muestra original.

4.2.2.1 Diseño y optimización de cebadores

Para la realización de este trabajo se han utilizado algunos cebadores diseñados previamente por nuestro grupo de trabajo y nuevos cebadores diseñados específicamente para este estudio. El primer paso a la hora de diseñar los cebadores fue la búsqueda en las bases de datos de la secuencia del gen que deseábamos amplificar. Siempre que fue posible se utilizaron las secuencias de los genes ovinos, si no se encontraban en el GeneBank se emplearon los de otras especies similares, como el bovino. Una vez encontrada la secuencia, realizamos un BLAST (*Basic Local*

Alignment Search Tool) del gen sobre todo el genoma del ovino o bovino. Este proceso permitió localizar los exones del gen con el que estábamos trabajando, con el fin de diseñar unos cebadores que hibridaran en dos exones distintos para evitar la amplificación de DNA genómico. Una vez localizados los exones mediante el programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) elegimos los cebadores que mejores características posean. Los cebadores utilizados para este trabajo se muestran en la Tabla 2.

4.2.2.2 PCR convencional

Una vez diseñados los cebadores tuvieron que ser validados y la reacción optimizada. Mediante una PCR convencional ajustamos la temperatura de hibridación o *annealing* y comprobamos que se producía la amplificación de un único fragmento. Las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 10 µl que contenían 2 µl de cDNA diluido 1:5 en agua purificada, 0.25 µl de cada cebador (20 pM), 5 µl de agua ultrapura, 1 µl de 4you4 dNTP Mix (Bioron), 1 µl de 10x Reaction Buffer MgCl₂ Free (Biotools), 0,5 µl de MgCl₂ 50 mM (Biotools) y 0,1 µl de TAQ DNA Polimerasa (Bioron). Las reacciones se llevaron a cabo en los termocicladores 2720 Thermal Cyclers y GeneAmp PCRSystem 2700 (Applied Biosystems). Los ciclos de tiempo y temperatura programados fueron: un primer paso para conseguir la desnaturalización de cDNA de 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, la temperatura de hibridación de cada cebador (58-60°C) durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. Por último se mantuvo la temperatura a 72°C durante 5 minutos para terminar de sintetizar las posibles copias incompletas. Las amplificaciones se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, visualizándose mediante fluorescencia gracias al agente intercalante Bromuro de Etidio.

Tabla 2: Cebadores utilizados para el análisis de expresión mediante RT-qPCR.

Genes	Número de acceso	Secuencias del cebador		Tamaño de amplicón (bp)
		<i>Forward (5' → 3')</i>	<i>Reverse (5' → 3')</i>	
Marcadores de superficie celular				
CD29	AF349461	GTGCCCCGAGCCTTCAATAAAG	CCCGATTTTCAACCTTGGTAATG	87
CD34	AB021662	TGGGCATCGAGGACATCTCT	GATCAAGATGGCCAGCAGGAT	107
CD45	NM_001206523	CCTGGACACCACCTCAAAGCT	TCCGTCCTGGGTTTTATCCTG	101
CD73	BC114093	TGGTCCAGGCCTATGCTTTTG	GGGATGCTGCTGTTGAGAAGAA	115
CD90	BC104530	CAGAATACAGCTCCCGAACCAG	CACGTGTAGATCCCCTCATCCTT	96
CD105	NM_001076397	CGGACAGTGACCGTGAAGTTG	TGTTGTGTTGGCCTCGATTA	115
Marcadores de diferenciación				
PPARγ	NM_001100921	GCCCTGGCAAAGCATTTGTA	TGTCTGTCGTCTTTCCCGTCA	94
SCD	AJ001048	CCCAGCTGTCAGAGAAAAGG	GATGAAGCACAAACAGCAGGA	115
IL6	FJ409227.1	CAGCAAGGAGACACTGGCAG	TGATCAAGCAAATCGCCTGAT	101
COL1A1	AF129287	CCTGCGTACAGAACGGCCT	ACAGCACGTTGCCGTTGTC	93
BGLAP	DQ418490	CCCAGGAGGGAGGTGTGTG	CTAGACCGGGCCGTAGAAGC	99
BGN	NM_001009201.1	AACATGAAGTGCATTGAGATGGG	GCGAAGGTAGTTGAGCTTCAGG	93
LUM	NM_173934.1	AAGCAATTGAAGAAGCTGCACA	TTAGTGAGCTGCAGGTCCACC	92
NEST	194665083	CAAATCGCCCAGGTCCTG	GCCTCTAGGAGGGTCCTGTATGT	95
NEFM	194669578	GCTCGTCATCTGCGAGAATACC	CACCCTCCAGGAGTTTCCTGTA	91
NEFL	27806522	CGCTATGCAGGACACAATCAAC	GGGTCTCCTCACCTTCCAAGA	161
TUBB3	116004470	GACCTCGAGCCTGGAACCAT	GCCCCACTCTGACCAAAGATG	92
MAP2	194664873	TGTCCAGTGGAGGAAGGTTT	TCTTGTCTAGTGGCTCGGCTG	95
PRNP	BC119821	CGCAGAAGCAGGACTTCTGAA	TGGATTTGTGTCTCTGGGAAGA	86
Genes normalizadores				
G6PDH	AJ507200	TGACCTATGGCAACCGATACAA	CCGCAAAAGACATCCAGGAT	76
HPRT	EF078978	AGGTGTTTATTCCTCATGGAGTAATTATG	GGCCTCCCATCTCCTTCATC	79

4.2.2.3 Secuenciación automática

La secuenciación de fragmentos se utilizó en el desarrollo del Trabajo Fin de Máster para comprobar que los productos de PCR de los genes del estudio se correspondían con los genes de interés. A continuación se describe brevemente los pasos que se siguieron para las secuenciaciones de las muestras.

Los productos de PCR fueron purificados con ExoSAP-IT® (USB) para eliminar nucleótidos, cebadores y otros componentes residuales. Posteriormente los productos purificados fueron secuenciados en reacciones separadas para cada uno de los cebadores utilizando el Big Dye® Terminador Cycle Sequencing Kit v.3.1. (Applied Biosystems). Finalmente, las secuencias fueron purificadas con el *kit* Big Dye® X-Terminator (Applied Biosystems) y sometidas a electroforesis capilar en el sistema de secuenciación automática ABI PRISM® 310 (Applied Biosystems). Todos los *kits* se utilizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.2.2.4 RT-qPCR

Antes de llevar a cabo la cuantificación de la expresión génica fue necesario optimizar la concentración de cebadores que nos permitiera una mejor eficiencia en la amplificación. Para ello se realizaron pruebas a distintas concentraciones para detectar aquella que presentara una buena amplificación sin la formación de dímeros. Generalmente la concentración seleccionada fue de 300nM. Mediante la realización de una curva estándar en el instrumento de RT-qPCR, en la que se amplificaban 5 diluciones 1:5 de una muestra que expresase el gen de elección, se calculó la pendiente y la eficiencia de la amplificación según la fórmula: $E=10^{-1/\text{pendiente}}$.

El fluoróforo utilizado fue la molécula intercalante de DNA SYBR® Green (Life Technologies) y se utilizó el aparato StepOne™ Real Time System (Life Technologies). Todas las reacciones se realizaron por triplicado empleando 2 µl de cDNA diluido 1:5 en agua ultrapura y 0,15 µl de cada cebador (20 pM) junto a 2,5 µl de agua purificada y 5 µl de Fast SYBR® Green Master Mix (Life Technologies) con un volumen total de 10 µl. Las condiciones generales empleadas fueron un paso inicial para la activación de la reacción y desnaturalización del cDNA de 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 3 segundos a 95°C y 30 segundos a la temperatura de

hibridación de cada cebador (58-60°C). Al finalizar la amplificación se realizó el protocolo para obtener la curva de disociación e identificar la presencia de bandas de amplificación no específicas o la presencia de altos niveles de dímeros.

Cuando se cuantifica la expresión de un gen se utilizan genes normalizadores, los cuales son genes constitutivos (*housekeeping genes*), para disminuir el error entre muestras generado por pasos previos a la cuantificación, como diferencias en la síntesis de cDNA o errores de pipeteo. Los genes normalizadores empleados en el estudio fueron Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (**G6PDH**) e Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferasa (**HPRT**). El factor de normalización al que referir la expresión de los genes de interés en cada muestra se calculó como la media geométrica de las dos medidas de expresión de *G6PDH* y *HPRT*.

Finalmente se empleó la prueba estadística *t* de Student para analizar las diferencias entre los cultivos control y los sometidos a diferenciación, considerándose estadísticamente significativos los resultados cuya $p < 0.05$.

4.3 Análisis de expresión de PrP^C mediante Dot Blotting

La técnica de *Dot Blotting* se utilizó para comprobar la expresión de PrP^C en los cultivos celulares de MSC previamente a la infección. Se utilizaron los reactivos del *kit* Prionics® -Check Western (Prionics). Alícuotas de 10⁶ células, mantenidas a -80°C en tubos de 1,5 ml, fueron homogeneizadas en 500 µl de tampón de homogenización Prionics® -Check Western (Prionics). A continuación las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C y se midió la concentración de proteína total en el sobrenadante mediante el método del ácido Bicinconónico BCA (Sigma Aldrich). Posteriormente, el extracto celular se centrifugó a 10.000 g durante 60 minutos a 4°C para precipitar las proteínas, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se diluyó en agua ultrapura para obtener una concentración final de 25 µg/µl. Se depositó un total de 50 µg muestra sobre una membrana de 0,2 µm Immun-Blot® PVDF (Bio-Rad) y, una vez adsorbida la muestra, la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente (**RT**) en tampón de bloqueo formado por leche desnatada en polvo resuspendida al 5% en TBST (Tampón Salino Tris con Tween 20 al 0.05 %). Las membranas se incubaron durante 1 hora a RT con el anticuerpo monoclonal de ratón

anti-PrP IgG₁ 6H4 (Prionics) diluido 1:5000 en tampón de bloqueo. Tras realizar tres lavados con TBST se incubó 1 hora a RT en el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Prionics) diluido 1:5000 en tampón de bloqueo. El revelado se realizó mediante el revelador CDP-Star® (Tropix) y las imágenes de quimioluminiscencia se obtuvieron mediante el revelador digital cuantificador Versa-Doc™ Imaging System Modelo 4000 (Bio-Rad).

4.4 Infección de las MSC

En este apartado se describe la metodología utilizada para la infección de las BM-MSC y las PB-MSC con extractos priónicos y la detección de la PrP^{Sc} en cultivos celulares.

4.4.1 Inoculación con scrapie

Para probar la capacidad de infección de las MSC por aislados priónicos se utilizaron inóculos del cerebro de animales sanos, como control negativo, y de animales enfermos. Las muestras obtenidas post-mortem se homogenizaron y diluyeron en una solución de suero salino fisiológico (Braun) en una proporción 1:10 (g/ml). Para evitar posibles contaminaciones en los cultivos, las muestras se sometieron a un tratamiento antibiótico con Sulfato de Estreptomicina (100 µg/ml) junto a Bencilpenicilina (100 µg/ml). Además se sometió a la muestra a un tratamiento térmico a 70°C durante 10 minutos. Antes de proceder a la inoculación se testaron las muestras mediante cultivo en agar sangre (5% sangre ovina) durante 48 horas a 37°C y se confirmó el crecimiento negativo.

Las MSC fueron sembradas a una densidad de 5.000 cels/cm², se mantuvieron 24 h en cultivo para permitir su adhesión a la placa, y se añadió el inóculo al medio de cultivo en una proporción 1:4. Se dejó en contacto con las MSC durante 72 horas antes de renovar el medio. Posteriormente el medio se renovó dos veces por semana. El cultivo se mantuvo hasta pase 7, en cada pase las células se mantenían hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia, posteriormente, las células se separaron de la superficie de la placa de cultivo por tratamiento con 0,25% tripsina/EDTA (Sigma-

Aldrich) y se contaron mediante la cámara de Neubauer. En este punto, una fracción de células fue sembrada a una densidad de 5.000 MSC/cm², que constituyó un nuevo pase, y el resto de las células fueron criopreservadas para la realización de experimentos posteriores. El medio de congelación en el que las células fueron resuspendidas estaba formado por un 90% de FBS y 10% de DMSO.

4.4.2 Determinación de PrP^{Sc} mediante Western Blotting

El *Western Blotting* se utilizó para confirmar la presencia de PrP^{Sc} en los cultivos de MSC. Las muestras de 10⁶ células se encontraban mantenidas a -80°C en tubos de 1,5 ml. La extracción de proteínas se realizó mediante la homogeneización de las muestras en 500 µl de tampón de homogenización Prionics® -Check Western (Prionics). Las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C y se midió la concentración de proteína total en el sobrenadante mediante el método del ácido Bicinónico BCA (Sigma Aldrich). Las muestras se diluyeron en el tampón de Prionics® -Check Western (Prionics) hasta una concentración de 1mg/ml. Aproximadamente 800 µg de proteína se sometieron a una digestión a 37°C durante 30 minutos con 35 µl de proteinasa K 1µg/µl (Prionics). Tras la digestión se centrifugó a 10.000 g durante 50 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 100 µl de gel de carga β-mercaptoetanol (Prionics) y se calentó a 100°C durante 10 minutos. El marcador de talla y control de transferencia utilizado fue el Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. La electroforesis se realizó con el gel Criterion™ XT al 12% Bis-Tris (Bio-Rad) cargando 10 µl de muestra. La migración se realizó sobre una membrana de transferencia de 0,45 µm Immobilon-P (Millipore Corporation). La membrana fue bloqueada con PVDF Blocking Buffer Concentrate 5x (Prionics) a concentración de trabajo 1x, durante media hora a RT. El anticuerpo primario empleado fue el monoclonal de ratón P4 (Biopharm) 1:2500 en TBST incubando toda la noche a 4°C en agitación. El anticuerpo secundario empleado fue el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Prionics) diluido 1:5000 en TBST e incubado 1 hora a RT. Por último se empleó el revelador CDP-Star® (Tropix). Las imágenes de quimioluminiscencia se obtuvieron con el lector Versa-Doc™ Imaging System Modelo 4000 (Bio-Rad).

4.5 Herramientas bioinformáticas

En el desarrollo de este trabajo se han utilizado diversos programas y bases de datos para la búsqueda de secuencias génicas específicas de oveja, diseño de cebadores para su uso en PCR, análisis de las amplificaciones. A continuación se detallan los programas y bases de datos utilizados en el presente Trabajo Fin de Máster.

- Búsqueda y recuperación de datos en sistemas integrados de búsqueda y bases de datos: ENTREZ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- Alineamiento y búsqueda de secuencias: BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).
- Diseño de cebadores: Primer Express Software 2.0 (Applied Biosystems).
- Visualización de secuencias y alineamiento: BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).
- Análisis de productos amplificados de RT-qPCR: StepOne™ software (Applied Biosystems).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados obtenidos durante la realización del Trabajo Fin de Máster y su discusión.

5.1 Aislamiento y caracterización de MSC

Desde los primeros días de cultivo de las células mononucleadas obtenidas tanto de sangre periférica como de médula ósea se observaron células con morfología de fibroblasto adheridas al plástico (Figura 3). La obtención de MSC a partir de médula ósea de ovino ya se ha descrito [232, 233, 253], sin embargo, esta es la primera vez que se describe un método para el aislamiento de MSC a partir de sangre periférica de oveja. Debido a la novedad, hemos realizado un análisis de caracterización más exhaustivo en las PB-MSC analizando la cinética de las diferenciaciones hacia linajes mesodérmicos. Para las BM-MSC sólo se ha comprobado la diferenciación en el punto final del proceso.

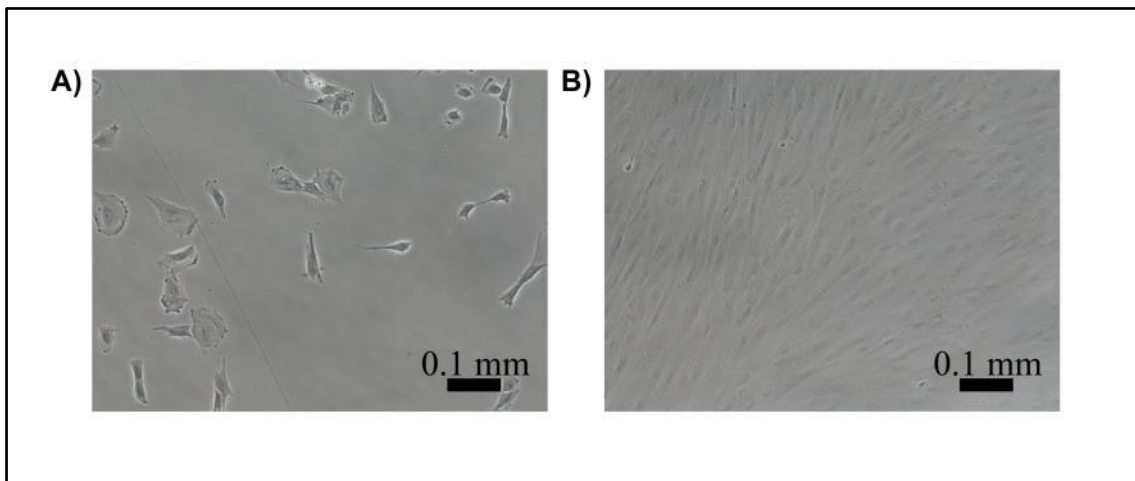
A pesar de que el volumen obtenido de sangre fue similar para todos los animales, el número de células nucleadas obtenidas fue variable. El rango de células mononucleadas obtenidas a partir de sangre periférica varió desde $0,594 \cdot 10^6$ hasta $1,9 \cdot 10^6$ células mononucleadas/ml, con una media de $1,35 \cdot 10^6 \pm 682646$ células/ml. Tras el proceso de aislamiento, se obtuvo una media de 281400 ± 178051 células adherentes por animal, obteniéndose entre 2700 y 9300 células adherentes por cada 10^6 células mononucleadas (media de 5850 ± 2700). En otras especies domésticas se ha observado que la cantidad de MSC en sangre periférica es baja [265], lo cual parece suceder también en ovino, ya que se observaron pocas colonias durante los cultivos de PB-MSC.

En el caso de la obtención de células a partir de médula ósea es más difícil partir de un volumen similar para todos los animales y la cantidad de células nucleadas obtenidas varió mucho entre individuos. Así, tras normalizar los datos frente al volumen de médula obtenido, el número de células aisladas tras los gradientes de centrifugación varió desde $0,16 \cdot 10^6$ hasta $2,73 \cdot 10^6$ células nucleadas/ml, con una media de $1,178 \cdot 10^6 \pm 1,18 \cdot 10^6$ células/ml. Tras el aislamiento quedó una media de 326462 ± 302288 células

por individuo, variando entre 116859 y 12195 células aisladas por cada 10^6 células mononucleadas de médula ósea, siendo la media de 57103 ± 50115 .

Las células se expandieron durante dos o tres pases para obtener una cantidad suficiente para llevar a cabo los ensayos de diferenciación en las tres líneas potenciales, adipocitos, condrocitos y osteoblastos, y caracterización mediante el análisis de la expresión de marcadores celulares de superficie. En estos pases se evaluó también la capacidad de proliferación de las células obtenidas.

Figura 3. Se muestran células procedentes de médula ósea con morfología de fibroblasto y adheridas al plástico después de 3 días (A) y 7 días (B) del aislamiento.



5.1.1 Capacidad de proliferación

La capacidad de proliferación de las células obtenidas a partir de sangre periférica se midió durante los dos pases en que se expandieron las células antes de su criopreservación. Se necesitó una media de 12,6 días para el primer pase, reduciéndose a 7,33 días durante el segundo pase. Los valores obtenidos para CD y DT en los dos pases se especifican en la Tabla 3.

La gran variabilidad individual en cuanto a la cantidad de MSC aisladas se ha descrito en el aislamiento de MSC de sangre periférica de otras especies, como la equina [266]. Sin embargo, los tiempos de doblaje observados en ovino son superiores a los descritos para el caballo. Estas diferencias podrían deberse a que en equino se utiliza

un medio con una concentración de FBS (30%) superior a la empleada en este trabajo, o también a la adición de dexametasona al medio de cultivo, la cual ha demostrado ser beneficiosa para la expansión de las MSC [267].

Las células obtenidas de médula ósea se expandieron hasta pase 3, y la capacidad de proliferación fue medida durante estos pases. La media de tiempo requerida para los tres pases fue de 7 días. Los datos de proliferación se muestran en la Tabla 3. La variabilidad detectada en este estudio se corresponde con la observada por otros autores en el análisis de MSC ovinas obtenidas a partir de la médula ósea [239].

Tabla 3. Datos obtenidos para la proliferación de BM-MSC y PB-MSC

PASE		BM-MSC	PB-MSC
1	<i>CD</i>	$2,96 \pm 1,21$	$2,29 \pm 0,887$
	<i>DT (días)</i>	$2,62 \pm 0,82$	$5,99 \pm 1,86$
2	<i>CD</i>	$1,36 \pm 0,29$	$1,84 \pm 0,975$
	<i>DT (días)</i>	$5,32 \pm 1,11$	$4,88 \pm 2,68$
3	<i>CD</i>	$2,50 \pm 0,23$	
	<i>DT (días)</i>	$2,82 \pm 0,27$	

5.1.2 Expresión de marcadores celulares de superficie mesenquimales

Para iniciar la caracterización de las BM-MSC y PB-MSC se ha analizado la expresión de los transcritos de seis marcadores específicos para células mesenquimales y hematopoyéticas mediante RT-qPCR. La utilización de estas técnicas basadas en la expresión génica son útiles a la hora de identificar estas moléculas descritas como marcadores de MSC [268, 269], principalmente en especies para las que no se dispone de anticuerpos comerciales con reactividad frente a sus epítomos. Así, se ha descrito una buena correlación entre los marcadores de expresión génica y el inmunofenotipo detectado por citometría de flujo en MSC equinas [224].

La falta de un fenotipo inmune bien definido para las MSC en sangre periférica dificulta su estudio. Además, muchas de los marcadores celulares utilizados en el análisis por citometría de flujo de MSC humanas no han sido probadas en ovino [233].

La expresión de los marcadores CD29, CD73, CD90 y CD105 es positiva en MSC humanas, y la expresión de CD34 y CD45 es negativa. En nuestro trabajo, tanto las BM-MSC como las PB-MSC ovinas analizadas expresaron *CD29*, *CD73*, *CD90* y mostraron lecturas negativas para el marcador hematopoyético *CD45*. Además se observó una débil expresión de *CD105* en ambos tipos celulares, siempre tras más de 32 ciclos de amplificación. La única diferencia observada entre ambas fuentes de MSC se corresponde con la expresión de *CD34*. Así, en las BM-MSC no se amplificó este marcador, mientras que 5 de los 6 cultivos de PB-MSC mostraron expresión de *CD34*.

Nuestros resultados concuerdan con los descritos por otros autores en la especie ovina. Utilizando citometría de flujo se ha demostrado la presencia de CD29 y CD105 en MSC ovinas obtenidas a partir de médula ósea [233, 243]. A partir de tejido adiposo se han obtenido marcajes positivos frente a CD90 [238], así como señales débiles para el marcador CD-105. En concordancia con la especie humana [270], las MSC ovinas obtenidas a partir de médula ósea [243] y de tejido adiposo [238] han demostrado ser negativas para la expresión de CD45. En este trabajo también se han obtenido resultados negativos para este marcador. En nuestro análisis *CD34* se amplificó en 5 de los 6 cultivos de PB-MSC, mostrando heterogeneidad individual. A pesar de que se describe como un marcador hematopoyético y que, por tanto, debería estar ausente en las MSC, este marcador fue detectado a bajos niveles mediante RT-qPCR en MSC humanas aisladas de sangre periférica [271] y en MSC equinas obtenidas de tejido adiposo [272].

A pesar de que la citometría de flujo es necesaria para corroborar el inmunofenotipo de las células aisladas, el perfil de expresión génica sugiere que tanto las células obtenidas a partir de médula ósea como las de sangre periférica cumplen las características adecuadas en cuanto a expresión de marcadores de superficie para ser consideradas MSC.

5.1.3 Potencial adipogénico

En los cultivos mantenidos en condiciones de adipogénesis se observaron por microscopio óptico gotas lipídicas, sin embargo, el tamaño de las gotas fue variable dependiendo del animal del que procedían las células. Para confirmar la naturaleza lipídica de las gotas, los cultivos se tiñeron con oil red O (Figuras 4 y 5 para las BM-MSc y PB-MSc respectivamente). La expresión de marcadores adipogénicos se analizó en los días 7 y 14 para las PB-MSc tras la inducción de la diferenciación. La expresión de *PPAR* γ , *SCD* e *IL6* se muestran en la Figura 7.

Como la capacidad adipogénica de las BM-MSc ovinas ya ha sido caracterizada por otros autores [232, 233] en este trabajo se analizan los marcadores de diferenciación adipogénica únicamente el último día de diferenciación para así confirmar la diferenciación observada previamente mediante las tinciones. Sin embargo, tanto los cultivos mantenidos en medio de crecimiento como los cultivos mantenidos en medio adipogénico presentaron un alto índice de mortalidad celular, impidiendo la medición de sus niveles de expresión mediante RT-qPCR. No obstante, los acúmulos de gotas lipídicas se observaron mediante tinción específica (Figura 4).

En los cultivos de PB-MSc se observó un aumento en la expresión de *PPAR* γ y *SCD* de 7.3 y 20.8 veces respectivamente, pero debido a la gran variabilidad entre animales, los resultados no han sido estadísticamente significativos. Por el contrario, se detectó un descenso significativo en la expresión de *IL6* a las 2 semanas de cultivo (Figura 7).

La diferenciación adipogénica mostró una gran variabilidad en cuanto a las gotas lipídicas observadas mediante tinción. Las variaciones en cuanto a la expresión génica concuerdan con la función conocida de estos marcadores y corroboran la diferenciación adipogénica observada mediante las técnicas de tinción. Así, *PPAR* γ es considerado como el principal regulador de la adipogénesis [273, 274] y se encuentra sobreexpresado en condiciones de adipogénesis [275]. La *SCD* únicamente se expresa en adipocitos, y cataliza la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados, desempeñando un papel fundamental en la adipogénesis [276]. Por último, la *IL6* es la encargada de mantener el estado indiferenciado y proliferativo de las MSC que derivan de médula ósea [277] y su expresión disminuye durante la diferenciación a los diferentes linajes celulares [278].

5.1.4 Potencial osteogénico

La capacidad de las células para diferenciarse a osteoblastos se demostró para las dos fuentes de MSC ovinas del estudio. Se utilizó la tinción de Alizarín Red y las agregaciones observadas con aspecto nodular aparecieron teñidas de rojo (Figuras 4 y 5 para las BM-MSC y PB-MSC respectivamente), al menos tras 21 días de cultivo, indicando que estas células se mineralizan en un estado muy tardío. La débil tinción observada en algunos de los cultivos puede ser debida a que el periodo necesario para la mineralización de las MSC ovinas descrito por otros autores varía de 21 días [243] a 5 semanas [233].

La expresión de marcadores de osteogénesis en las BM-MSC se analizó únicamente el último día de cultivo (21 días) y no mostró cambios significativos para ninguno de los dos marcadores analizados (Figura 6). Tanto *COL1A1* como *BGLAP* se mantuvieron en niveles similares a los controles tras tres semanas en cultivo, mostrando una gran desviación estándar.

El análisis de la expresión de marcadores en las PB-MSC positivas a la tinción con Alizarín Red (dos cultivos) no mostró cambios significativos en los niveles de *COL1A1* en las primeras 2 semanas de cultivo. Asimismo, después de 3 semanas la expresión de este marcador se redujo. Por el contrario, la expresión del marcador *BGLAP* aumentó durante el periodo de cultivo (Figura 7).

A pesar de que *COL1A1* está considerado como un marcador temprano de osteogénesis [279], no se han observado cambios estadísticamente significativos en los últimos días de cultivo en ninguno de los dos tipos celulares, incluso se advirtió un descenso en la expresión del mismo. De acuerdo con nuestros resultados, la bibliografía describe un ascenso poco marcado de la expresión del mRNA de *COL1A1* tras la diferenciación osteogénica en la especie humana [280], porcina [281] y equina [264]. Igualmente se ha descrito el descenso de este marcador en las MSC humanas obtenidas a partir de sangre periférica [282]. En consecuencia, no parece ser un marcador apropiado para comprobar la diferenciación de las MSC en muchas especies, y particularmente de las MSC ovinas. Sin embargo *BGLAP* se mostró sobreexpresado durante la diferenciación para PB-MSC, coincidiendo con la tinción positiva a Alizarín Red. Estos datos parecen estar en concordancia con que *BGLAP* sea un marcador tardío de los osteoblastos y aparezca junto a la mineralización de la matriz celular [283].

Un hallazgo sorprendente de nuestro trabajo fue encontrar la aparición de algún cultivo de BM-MSc y PB-MSc con diferenciación espontánea hacia adipocitos en condiciones de diferenciación osteogénica (Figura 8). Esta diferenciación espontánea parece indicar que las MSc ovinas presentan una gran capacidad adipogénica y un menor potencial osteogénico.

5.1.5 Potencial condrogénico

La condrogénesis se evaluó en un cultivo bidimensional con una alta concentración celular, siguiendo el protocolo de Jäger y colaboradores [247] para la diferenciación condrogénica de MSc ovinas obtenidas a partir de sangre umbilical. Se observaron nódulos que se tiñeron con Alcian blue, tanto en las células control como en las diferenciadas. Para las PB-MSc se observó la formación de agregados nodulares tanto en los cultivos controles como en los diferenciados, sin embargo, los medios diferenciados presentaron una fuerte tinción frente a Alcian blue (Figura 5). En el caso de las BM-MSc los agregados únicamente se presentaron en los controles, y solo estos se tiñeron de forma muy débil (Figura 4). A pesar de esta falta de tinción, el análisis de expresión de marcadores condrogénicos en el último día de cultivo (21 días) de las BM-MSc reveló un descenso de *BGN* y un aumento estadísticamente significativo de *LUM* (Figura 6). De forma similar, aunque las PB-MSc no presentaron variaciones en la expresión génica de *BGN*, si que se observó un aumento de *LUM* el día 21 de cultivo (Figura 7).

La confirmación de la condrogénesis mediante marcadores moleculares mostró dificultad, ya que la expresión de *BGN* y *LUM* resultó contradictoria durante la diferenciación de las BM-MSc y las PB-MSc. En otros trabajos tampoco se ha descrito una importante sobreexpresión de *BGN* en la inducción condrogénica en *micropellets* de BM-MSc ovinas [243]. En consecuencia, se requieren más análisis para confirmar la capacidad de diferenciación de las BM-MSc y las PB-MSc a condrocito.

Figura 4. Diferenciación de las BM-MSC hacia linajes mesodérmicos. Imágenes de la tinción con oil red O tras 21 días en medio control (A) y medio adipogénico (B). Imágenes de la tinción con Alizarín Red tras 21 días de cultivo en medio control (C) y medio osteogénico (D). Imágenes de la tinción con Alcian blue tras 21 días de cultivo en medio control (E) y medio condrogénico (F).

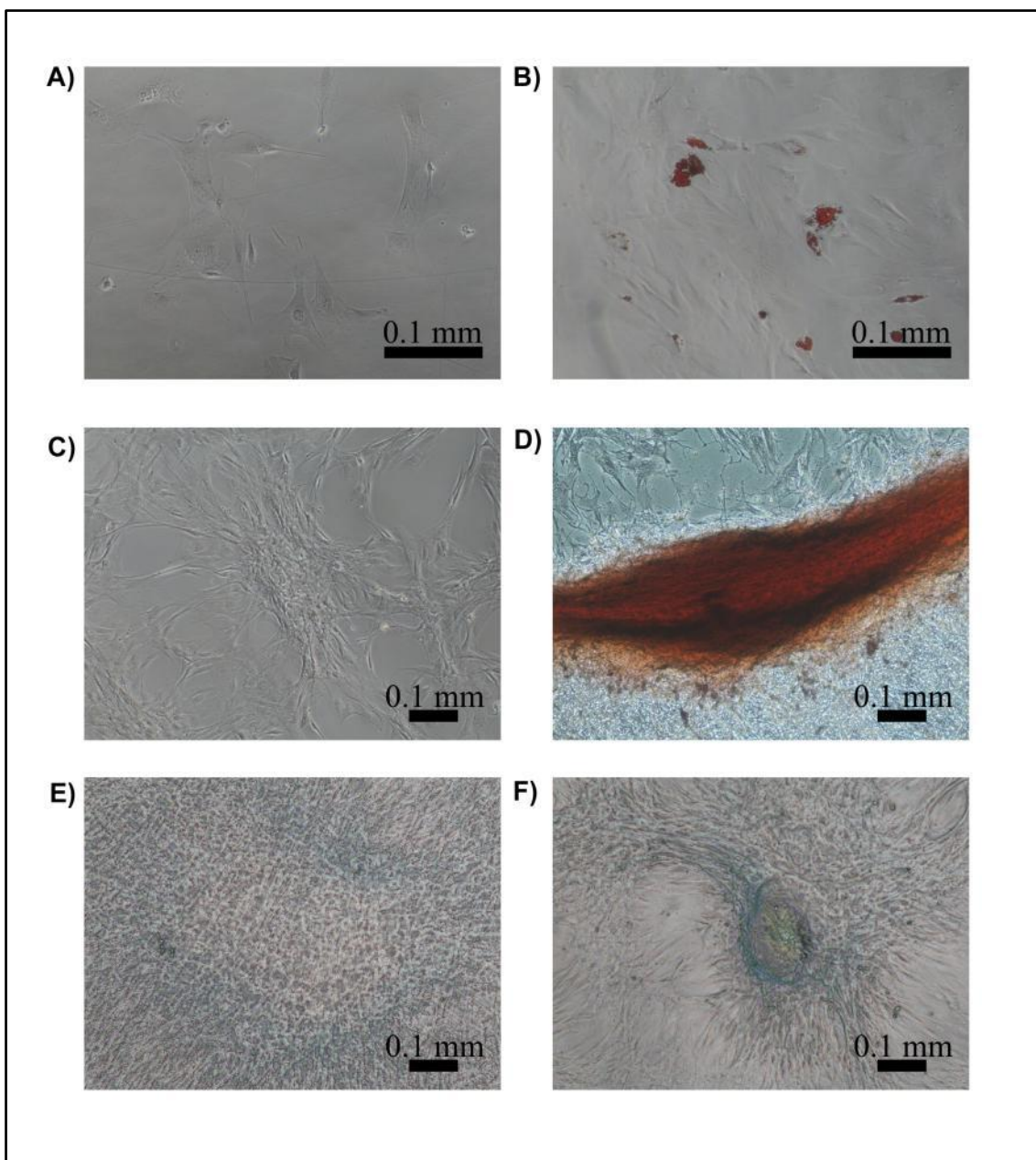


Figura 5. Diferenciación de las PM-MSC hacia linajes mesodérmicos. Imágenes de la tinción con oil red O tras 21 días en medio control (A) y medio adipogénico (B). Imágenes de la tinción con Alizarín Red tras 21 días de cultivo en medio control (C) y medio osteogénico (D). Imágenes de la tinción con Alcian blue tras 21 días de cultivo en medio control (E) y medio condrogénico (F).

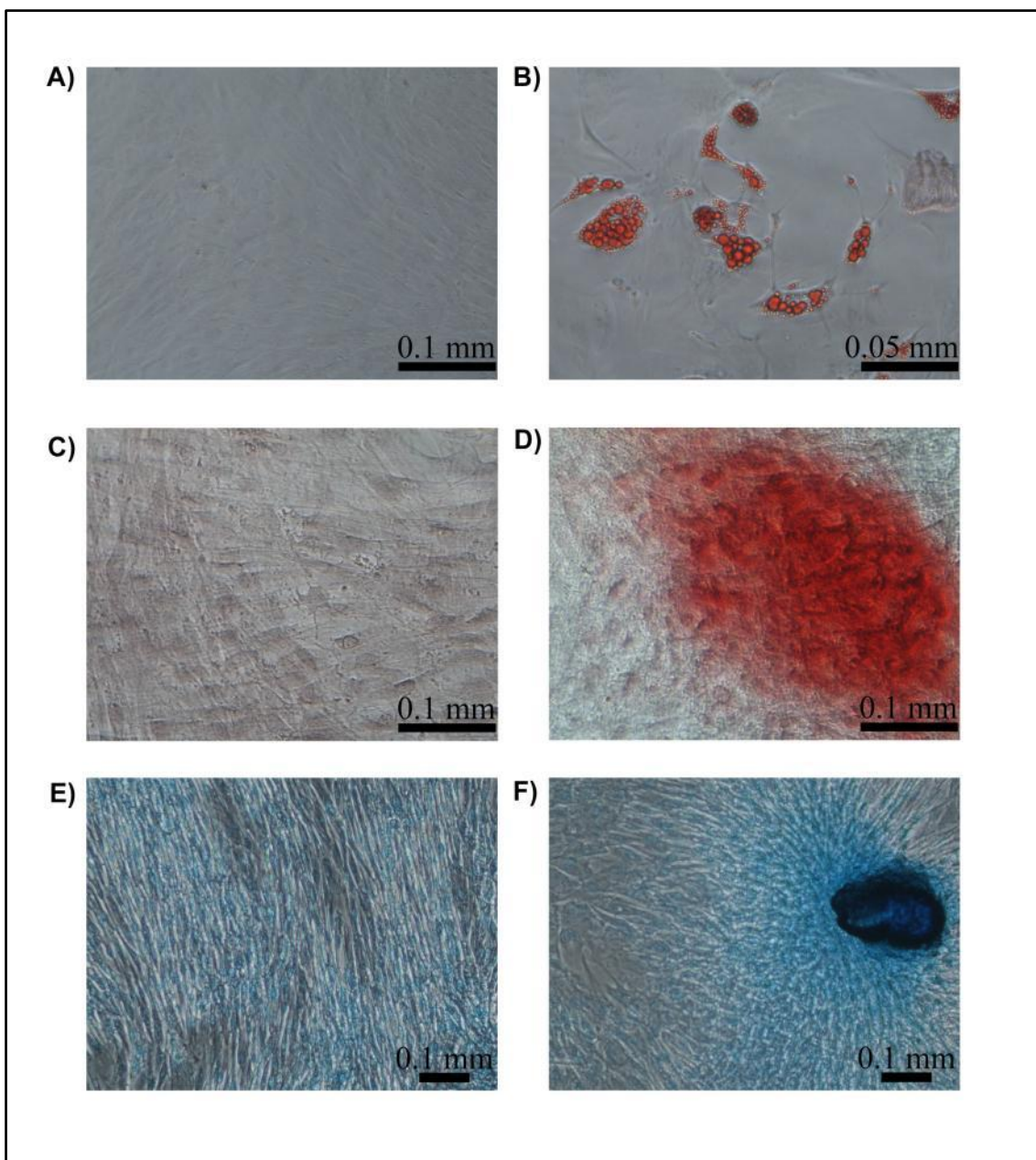


Figura 6. Expresión de los marcadores de diferenciación en las BM-MSC analizados mediante RT-qPCR. Expresión relativa a los niveles observados en los controles (valores marcados como 1, línea horizontal) de marcadores osteogénicos (A) y condrogénicos (B) a día 21 de diferenciación. Los datos se muestran como la media \pm los errores estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos diferenciados y control se han determinado mediante la prueba *t* de Student. (* $P < 0.05$)

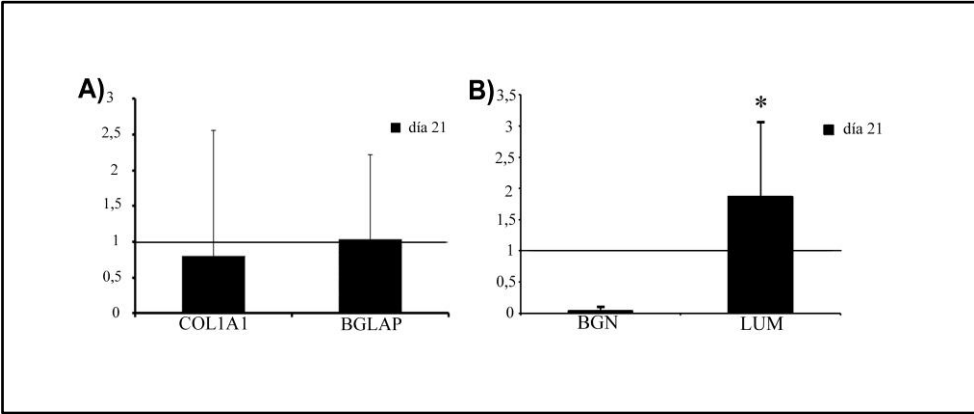


Figura 7. Expresión de los marcadores de diferenciación en las PB-MSC analizados mediante RT-PCR. Expresión relativa a los niveles observados en los controles (valores marcados como 1, línea horizontal) de marcadores adipogénicos (A), osteogénicos (B) y condrogénicos (C) en los diferentes días de diferenciación. Los datos se muestran como la media \pm los errores estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos diferenciados y control se han determinado mediante la prueba *t* de Student. (* $P < 0.05$).

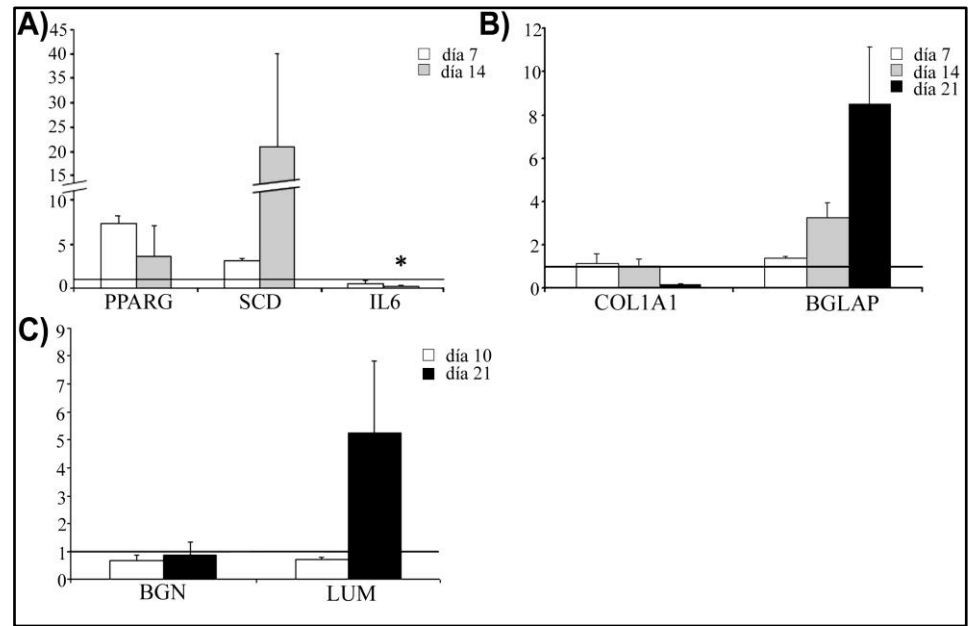
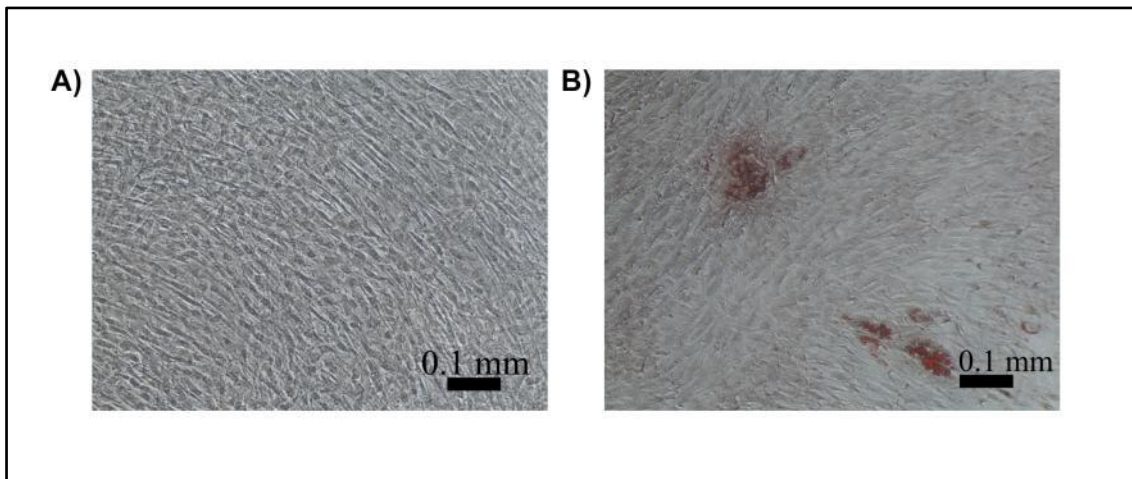


Figura 8. Tinción de Alizarín Red y oil red O, mostrando cultivos de BM-MSc mantenidos 21 días en medio control (A), y medio de diferenciación osteogénica (B), en el que se aprecia la mineralización de la matriz extracelular y el acúmulo de gotas lipídicas en el interior celular.



5.2 Diferenciación neurogénica

La capacidad de las MSC para transdiferenciarse a células del sistema nervioso se ha evaluado *in vitro* bajo condiciones de diferenciación neurogénica. Este es el primer trabajo que analiza esta capacidad en MSC ovinas. A diferencia de los aparatos anteriores, la cinética de diferenciación se ha evaluado tanto en BM-MSc como en PB-MSc ya que ambas fuentes presentan gran interés para alcanzar nuestro objetivo de desarrollar modelos *in vitro* para el estudio de enfermedades priónicas.

Después de 24 horas en condiciones de diferenciación se pudieron observar cambios morfológicos en los cultivos. Así, las células diferenciadas se mostraron bien definidas, con cuerpos retraídos hacia el núcleo y elongaciones finas, a menudo ramificadas (Figuras 7 y 8).

En un primer ensayo de diferenciación neurogénica de las BM-MSc, donde las células se sembraron siguiendo las recomendaciones para las MSC humanas (2500 MSC/cm²), se observó una alta mortalidad en las células control. A pesar de que los cambios morfológicos de las células diferenciadas fueron evidentes, la mortalidad celular nos impidió analizar la expresión de marcadores neurogénicos. Para evitar esta pérdida celular realizamos un segundo estudio aumentando la densidad de siembra a

5000 MSC/cm². En este caso, a pesar de que se siguió advirtiendo mortalidad, también se observaron cambios morfológicos en las células diferenciadas (Figura 9), y la cantidad de células fue suficiente para realizar el análisis por RT-qPCR de las BM-MSCs (Figura 9). Se observó un aumento de *MAPP2* en los días 3 y 6 de cultivo. Sin embargo, al igual que en las diferenciaciones hacia linajes mesodérmicos, la variabilidad interindividual fue muy elevada, por lo que el incremento no fue estadísticamente significativo. La expresión de *NEFM*, *TUBB3* y *NELF* se mantuvo apenas sin variaciones para todos los días de cultivo. Al contrario de lo esperado, *NES* mostró un descenso significativo los días 3 y 6 de cultivo. Finalmente se observaron niveles de *PRNP* similares a los controles, excepto el día 6 de cultivo, donde se observó una tendencia de aumento para el marcador ($p < 0,1$).

La diferenciación neuronal de las PB-MSCs también ha sido evaluada mediante RT-qPCR (Figura 10). En este caso, las condiciones recomendadas para la diferenciación de MSC humanas fueron adecuadas para la realización del estudio y se pudieron observar cambios morfológicos en las células mantenidas en condiciones de diferenciación (Figura 10). Las células control mostraron un nivel muy bajo o nulo de expresión de *NELF* en los días 3 y 6 de cultivo, mientras que se detectó una baja expresión de los restantes marcadores: *MAP2*, *NES*, *NEFM* y *TUBB3*. La expresión de estos marcadores incrementó en condiciones de neurogénesis, teniendo el máximo de expresión a día 6. Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para *NELF* en el día 3 de cultivo y se detectó una tendencia de sobreexpresión para *MAP2* en el día 6. También se observó un aumento de hasta 5 veces en la expresión de *PRNP* el último día de cultivo (día 6).

En los últimos años se ha descrito la transdiferenciación neuronal *in vitro* de MSC de diferentes especies, como la murina o la humana [284-286]. En este trabajo, además de los cambios morfológicos observados en ambos tipos celulares, se han estudiado la expresión de marcadores de neurogénesis presentes durante la diferenciación neuronal: *MAP2*, *NEFM*, *NELF*, *NES* y *TUBB3*. En el caso de las PB-MSCs el aumento de los marcadores de diferenciación ha sido más evidente que en las BM-MSCs, indicando una mayor capacidad neurogénica para las MSC ovinas derivadas de sangre periférica. La variabilidad observada en la capacidad para transdiferenciarse a neurona podría explicarse por la alta variabilidad interindividual mostrada en la expresión de marcadores neuronales en MSC previa a la diferenciación [245].

Por tanto, las BM-MSC y PB-MSC parecen conservar la capacidad de transdiferenciación, asimismo, la presencia de *PRNP* se ha demostrado en ambos tipos celulares previa a la diferenciación, y se ha observado su sobreexpresión durante la diferenciación neuronal. La sobreexpresión de *PRNP* podría estar involucrada con los cambios morfológicos, ya que la PrP^C parece ser necesaria para la neuritogénesis [287]. Esta capacidad de expresión de *PRNP* convierte a ambos tipos celulares en excelentes candidatos para el desarrollo de modelos celulares de enfermedades priónicas.

Figura 9. Diferenciación neurogénica de BM-MSC. Imágenes de microscopía por contraste de fases de fases de las BM-MSC ovinas cultivadas en medio neurogénico durante 3 días. Las células control (A) muestran una morfología fibroblástica mientras que las células diferenciadas (B) muestran características compatibles con neuronas: cuerpos brillantes, extensiones multipolares y finales en ramificación (C: más aumentos). Se muestran los niveles de expresión evaluados por RT-PCR de marcadores neuronales para los diferentes días en cultivo relativos a los niveles mostrados por los cultivos en medio de crecimiento (valores marcados como 1, línea horizontal). Los datos se muestran como medias \pm los errores estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos diferenciados y control se han determinado mediante la prueba *t* de Student. (* $P < 0.05$)

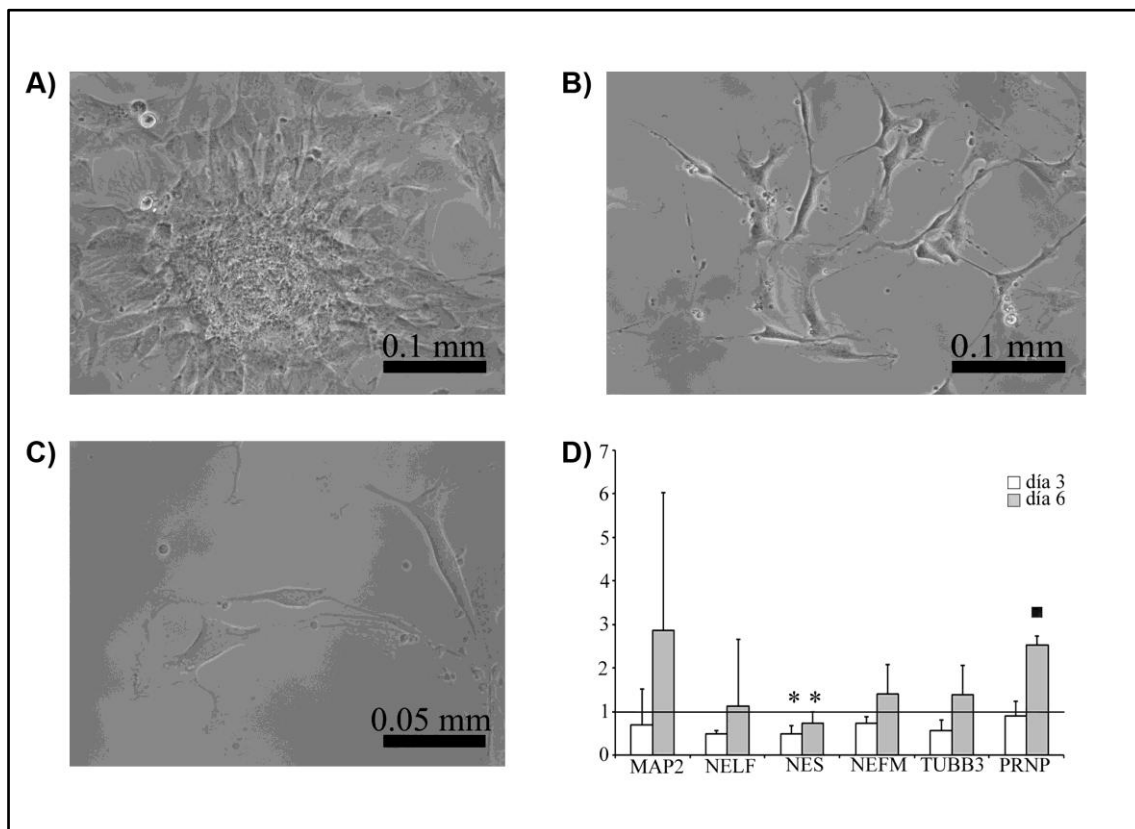
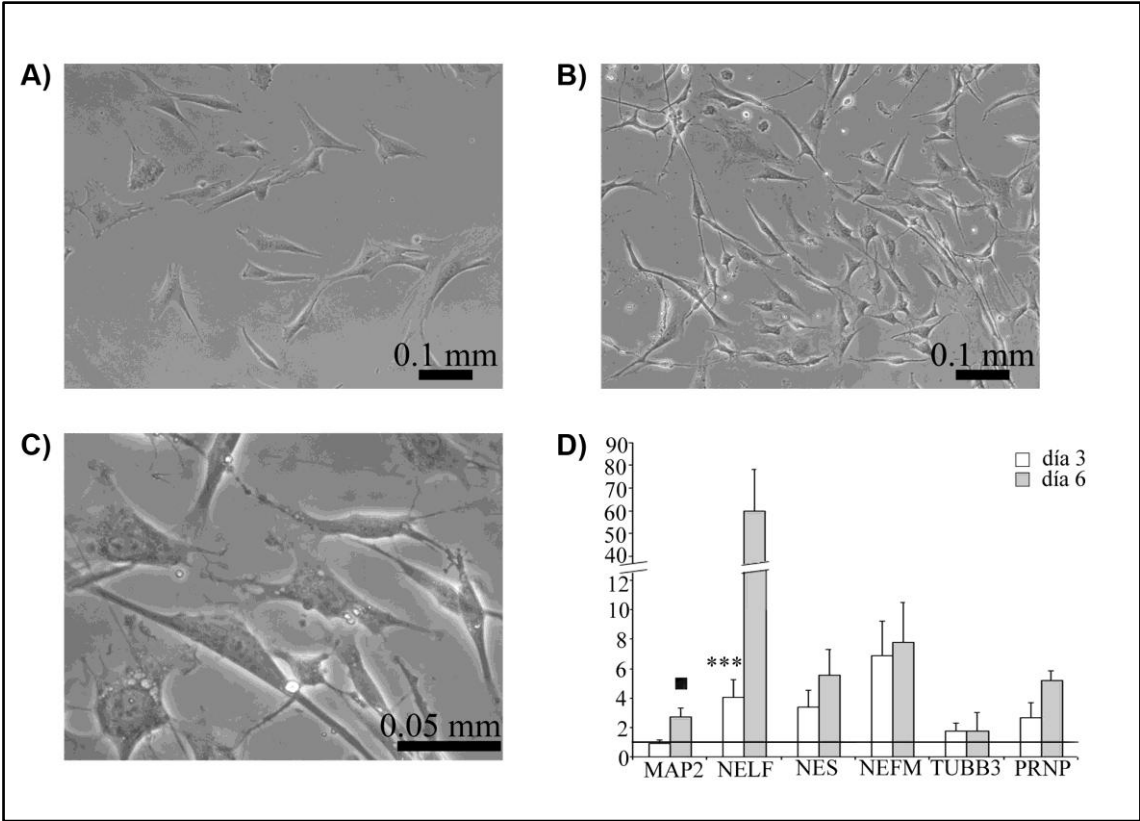


Figura 10. Diferenciación neurogénica de PM-MSC. Imágenes de microscopía por contraste de fases de fases de las PM-MSC ovinas cultivadas en medio neurogénico durante 3 días. Las células control (A) muestran una morfología fibroblástica mientras que las células diferenciadas (B) muestran características compatibles con neuronas: cuerpos brillantes, extensiones multipolares y finales en ramificación (C: más aumentos). Se muestran los niveles de expresión evaluados por RT-PCR de marcadores neuronales para los diferentes días en cultivo relativos a los niveles mostrados por los cultivos en medio de crecimiento (valores marcados como 1, línea horizontal). Los datos se muestran como medias \pm errores estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos diferenciados y control se han determinado mediante la prueba *t* de Student. (* $P < 0.05$)



5.3 Infección de MSC con aislado priónico de scrapie clásico

Una vez que la expresión de PRNP fue confirmada a nivel de transcritos, antes de realizar la infección de las células, confirmamos que esta expresión se veía reflejada a nivel proteico. La especificidad de los anticuerpos utilizados para la determinación de la PrP ovina es muy alta y ha sido validada en múltiples laboratorios de diagnóstico, en consecuencia se planteó la evaluación de la expresión de PrP^C mediante Dot Blotting (Figura 11), ya que supone una prueba más rápida y sencilla en su realización, y que permite seleccionar las muestras para su posterior estudio mediante Western Blotting. Se han obtenido resultados positivos para 3 de 4 animales en los que se analizaron muestras tanto de BM-MSC como de PB-MSC. Este resultado parece indicar que, al igual que ocurre a nivel de transcritos, los niveles de expresión de PrP^C pueden ser variables dependiendo del animal. La técnica de Dot Blotting permite cuantificar la expresión de PrP^C en los diversos cultivos. En consecuencia, se utilizará para evaluar los niveles de expresión de las MSC ovinas de nuestro banco con el fin de determinar aquellos cultivos que presenten una mayor expresión de la proteína. Además se utilizará para confirmar a nivel proteico la sobreexpresión de PrP^C en los cultivos de MSC ovinas en condiciones neurogénicas.

Los ensayos de inoculación se están poniendo a punto en un reducido número de muestras para evitar el gasto de extractos positivos, debido al valor de este material biológico. Tras la inoculación sobre los cultivos la presencia de PrP^{Sc} fue detectada mediante digestión con proteinasa K de los extractos proteicos y posterior realización de Western Blotting. Esta técnica permite identificar la proteína PrP resistente a proteasas, confirmando así la infección del cultivo.

Tras la incubación de 72 h de las células con los extractos de cerebro infectado por priones se detectó una gran muerte celular, probablemente debido a una pobre oxigenación de las células producida por el exceso de inóculo. En consecuencia, actualmente se están poniendo a punto nuevos protocolos de infección en los cuales la mortalidad se ha eliminado, pero todavía no tenemos resultados de la infección.

A pesar de la mortalidad, las células que sobrevivieron mantuvieron su capacidad de proliferación y se expandieron hasta el pase 3. En este pase se evidenciaron importantes niveles de PrP^{Sc}, tanto en un cultivo de PB-MSC como en otro de BM-MSC (Figura 12). El cultivo de PB-MSC infectado mostró mayor intensidad de

PrP^{Sc} por lo que se evaluó la capacidad del mismo para propagar la infección en pases posteriores. Así, se expandió hasta 10 pases posinfección y se evaluó la presencia de PrP^{Sc} en los pases 5, 7 y 10. En contra de lo publicado por otros autores en la especie murina [210], la presencia de PrP^{Sc} se evidenció sólo hasta el pase 3 posinfección (Figura 13). El cultivo infectado presentaba una gran capacidad de proliferación que creemos estaría impidiendo la transmisión de la infectividad de unas células a otras, ya que no están en contacto el tiempo suficiente. Únicamente las células que se infectaron en un primer momento y las derivadas de ellas presentarían la infección, por lo que ésta se diluiría en los sucesivos pases [180].

Con el fin de evitar esta pérdida de infectividad y de favorecer la infección de las células, se están valorando distintas condiciones de cultivo con menor porcentaje de suero para ralentizar el crecimiento celular. La infección de células diferenciadas podría favorecer la replicación del prión ya que en principio expresarían mayores niveles de proteína prión y siendo menor su capacidad proliferativa.

Por otra parte, la infección con aislados de scrapie podría estar produciendo cierta toxicidad en el cultivo. En los estudios realizados en la especie murina no se observó toxicidad [210], pero en este estudio trabajamos con una especie naturalmente susceptible a la enfermedad. Se necesitan estudios de viabilidad celular para analizar esta posible toxicidad y confirmar o rechazar esta hipótesis.

Las investigaciones realizadas en el presente trabajo abren nuevas vías de estudio, como es el análisis de la sensibilidad de estas células a la infección en función de su genotipo para *PRNP*, que en caso de resultar distinta podría permitir la tipificación de distintas cepas de scrapie (clásico y atípico) o de BSE. También permitiría el estudio de la toxicidad de la infección con prión en MSC, con y sin diferenciación a células neuronales. Si se consiguiera multiplicar la infectividad, estos cultivos podrían servir como método de diagnóstico para amplificar la señal de tejidos levemente infectados. Finalmente, el estudio de las MSC procedentes de animales en distintas fases de la enfermedad contribuiría al conocimiento de la patogenia de estas enfermedades.

Figura 11. Dot Blotting de expresión de PrP en BM-MSD (BM) y PB-MSD (PB). La imagen muestra la expresión de PrP en muestras de cuatro animales (A (Negativo), B, C y D) para muestras de PB-MSD y de BM-MSD, la prueba se ha realizado por duplicado (segunda línea).

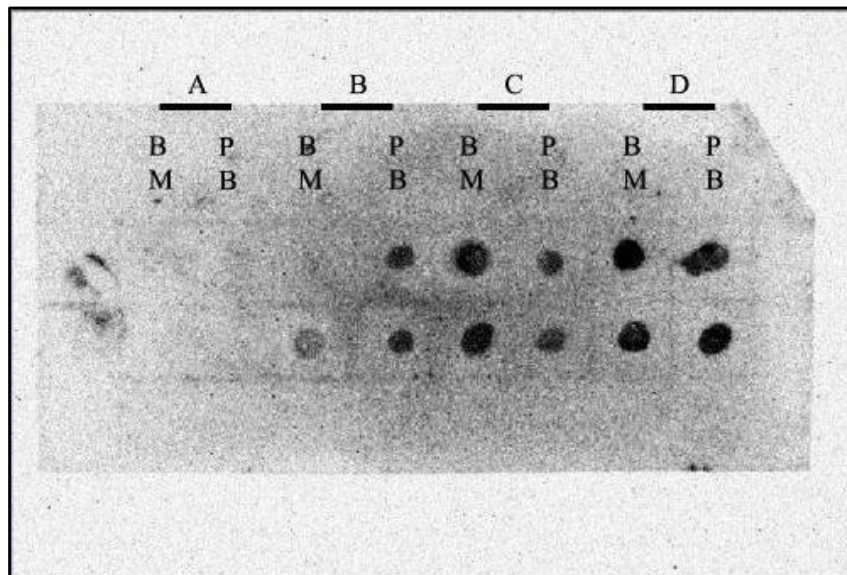
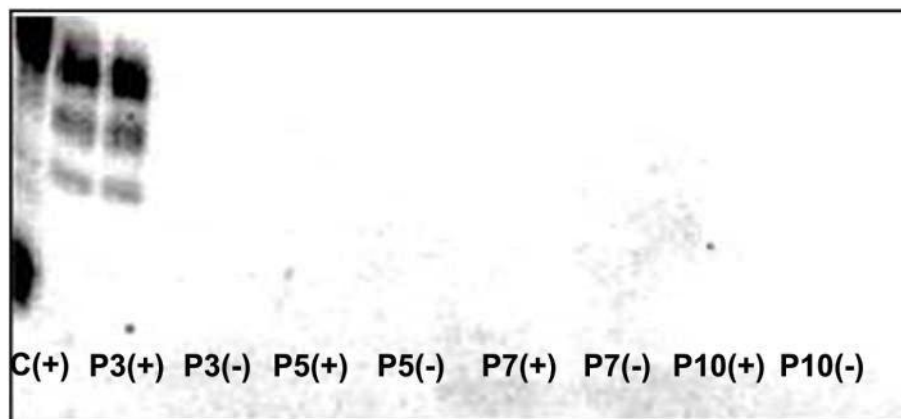


Figura 12. Western Blotting de expresión de PrP^{Sc} en muestras de PB-MSD (PB) y BM-MSD (BM). La imagen muestra resultados positivos (bandas de 27-30 kDa tras la digestión de las muestras con proteinasa K) en pase 3 tras la infección (PB1 (+), PB2 (+) y BM1 (+)).



Figura 13. Western Blotting de expresión de PrP^{Sc} en muestras de PB-MSC. La imagen muestra resultados positivos (bandas de 27-30 kDa tras la digestión de las muestras con proteinasa K) en fase 3 (P3) tras la infección. La detección es negativa para las mismas muestras tras 5 pases (p5), 7 pases (P7) y 10 pases (P10) postinfección.



6 CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se describe por primera vez el aislamiento de células mesenquimales a partir de sangre periférica de ovino. Estas células presentan marcadores de superficie mesenquimales y conservan su capacidad para diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos.
2. La gran variabilidad individual, manifestada en la heterogeneidad de los resultados obtenidos en la diferenciación a linajes mesodérmicos de las PB-MSc y BM-MSc ovinas pone de manifiesto la necesidad de realizar más estudios para optimizar las condiciones de cultivo y confirmar la idoneidad de estas células para estudios en los que la diferenciación a estos linajes sea imprescindible.
3. Las células mesenquimales ovinas de ambos orígenes muestran capacidad para transdiferenciarse a células de origen neurogénico, expresando además el gen *PRNP* y la proteína príon celular. Estas características ofrecen grandes posibilidades para el desarrollo de modelos *in vitro* para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas en ovino, modelo ideal de hospedador natural para las enfermedades priónicas.
4. El presente trabajo demuestra por primera vez la infección de MSc con priones en un hospedador natural de las enfermedades priónicas. La presencia de PrP^{Sc} se mantiene a niveles detectables hasta el tercer pase postinfección. Futuros trabajos clarificarán si la pérdida de infectividad se debe a la excesiva división de las MSc en cultivo o a una posible toxicidad del príon.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr.: **Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein.** *J Biol Chem* 1993, **268**(27):20276-20284.
2. Soto C: **Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases.** *Nat Rev Neurosci* 2003, **4**(1):49-60.
3. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG: **A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK.** *Lancet* 1996, **347**(9006):921-925.
4. Prusiner SB: **Prions.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(23):13363-13383.
5. Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R: **A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle.** *Vet Rec* 1987, **121**(18):419-420.
6. Wilesmith JW: **Bovine spongiform encephalopathy and related diseases: an epidemiological overview.** *N Z Vet J* 1994, **42**(1):1-8.
7. Prince MJ, Bailey JA, Barrowman PR, Bishop KJ, Campbell GR, Wood JM: **Bovine spongiform encephalopathy.** *Rev Sci Tech* 2003, **22**(1):37-60.
8. Eggenberger E: **Prion disease.** *Neurol Clin* 2007, **25**(3):833-842, viii.
9. Ironside JW, Head MW: **Neuropathology and molecular biology of variant Creutzfeldt-Jakob disease.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2004, **284**:133-159.
10. Smith PG, Cousens SN, d' Huillard Aignaux JN, Ward HJ, Will RG: **The epidemiology of variant Creutzfeldt-Jakob disease.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2004, **284**:161-191.
11. Watts JC, Balachandran A, Westaway D: **The expanding universe of prion diseases.** *PLoS Pathog* 2006, **2**(3):e26.
12. Riesner D: **Molecular basis of prion diseases.** *J Neurovirol* 2002, **8 Suppl 2**:8-20.
13. DeArmond SJ, Prusiner SB: **Etiology and pathogenesis of prion diseases.** *Am J Pathol* 1995, **146**(4):785-811.
14. Cuillé J, Chelle PL: **La tremblante du mouton est bien inoculable.** *CR Acad Sci (Paris)* 1938, **206**:78-79.
15. Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB: **Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee.** *Science* 1968, **161**(839):388-389.
16. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M: **Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees.** *Nature* 1966, **209**(5025):794-796.
17. Porter DD, Porter HG, Cox NA: **Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice.** *J Immunol* 1973, **111**(5):1407-1410.
18. Williams AE, Lawson LJ, Perry VH, Fraser H: **Characterization of the microglial response in murine scrapie.** *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994, **20**(1):47-55.
19. Rezaie P, Lantos PL: **Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies.** *Brain research Brain research reviews* 2001, **35**(1):55-72.
20. Jeffrey M, Scott JR, Fraser H: **Scrapie inoculation of mice: light and electron microscopy of the superior colliculi.** *Acta Neuropathol* 1991, **81**(5):562-571.
21. Liberski PP, Yanagihara R, Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC: **White matter ultrastructural pathology of experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice.** *Acta Neuropathol* 1989, **79**(1):1-9.
22. Liberski PP, Yanagihara R, Wells GA, Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC: **Ultrastructural pathology of axons and myelin in experimental scrapie in hamsters and bovine spongiform encephalopathy in cattle and a comparison with the panencephalopathic type of Creutzfeldt-Jakob disease.** *J Comp Pathol* 1992, **106**(4):383-398.

23. Sigurdsson B: **Rida, a chronic encephalitis of sheep. With general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics.** *Br Vet J* 1954, **110**:341-354.
24. Thormar H: **Slow infections of the central nervous system. II.** *Z Neurol* 1971, **199**(3):151-166.
25. Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC: **Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?** *Nature* 1967, **214**(5090):764-766.
26. Alper T, Haig DA, Clarke MC: **The exceptionally small size of the scrapie agent.** *Biochem Biophys Res Commun* 1966, **22**(3):278-284.
27. Griffith JS: **Self-replication and scrapie.** *Nature* 1967, **215**(5105):1043-1044.
28. Pattison IH, Jones KM: **The possible nature of the transmissible agent of scrapie.** *Vet Rec* 1967, **80**(1):2-9.
29. Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB: **Identification of a protein that purifies with the scrapie prion.** *Science* 1982, **218**(4579):1309-1311.
30. Prusiner SB: **Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.** *Science* 1982, **216**(4542):136-144.
31. Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM *et al*: **Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain.** *Nature* 1985, **315**(6017):331-333.
32. Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE *et al*: **A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein.** *Cell* 1985, **40**(4):735-746.
33. Robakis NK, Sawh PR, Wolfe GC, Rubenstein R, Carp RI, Innis MA: **Isolation of a cDNA clone encoding the leader peptide of prion protein and expression of the homologous gene in various tissues.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986, **83**(17):6377-6381.
34. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C: **Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene.** *Cell* 1986, **46**(3):417-428.
35. Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB: **Synthetic mammalian prions.** *Science* 2004, **305**(5684):673-676.
36. Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C: **In vitro generation of infectious scrapie prions.** *Cell* 2005, **121**(2):195-206.
37. Collinge J, Palmer MS, Sidle KC, Gowland I, Medori R, Ironside J, Lantos P: **Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals.** *Lancet* 1995, **346**(8974):569-570.
38. Lasmezas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, Fournier JG, Hauw JJ, Rossier J, Dormont D: **Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein.** *Science* 1997, **275**(5298):402-405.
39. Harris DA, Lele P, Snider WD: **Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(9):4309-4313.
40. Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J: **The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?** *Development* 1992, **115**(1):117-122.
41. Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schurmann P, Windl O, Brose N, Kretzschmar H: **Evidence of presynaptic location and function of the prion protein.** *J Neurosci* 1999, **19**(20):8866-8875.
42. Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B: **Developmental expression of the prion protein gene in glial cells.** *Neuron* 1995, **14**(3):509-517.
43. Burthorn J, Urban B, Pain A, Roberts DJ: **The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells.** *Blood* 2001, **98**(13):3733-3738.
44. Krebs B, Dorner-Ciossek C, Schmalzbauer R, Vassallo N, Herms J, Kretzschmar HA: **Prion protein induced signaling cascades in monocytes.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **340**(1):13-22.

45. Aguzzi A, Polymenidou M: **Mammalian prion biology: one century of evolving concepts.** *Cell* 2004, **116**(2):313-327.
46. Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM: **Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse.** *Neuroscience* 2002, **113**(1):177-192.
47. Tagliavini F, Prelli F, Porro M, Salmona M, Bugiani O, Frangione B: **A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: implications for prion-related encephalopathies.** *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **184**(3):1398-1404.
48. Chen S, Mange A, Dong L, Lehmann S, Schachner M: **Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival.** *Mol Cell Neurosci* 2003, **22**(2):227-233.
49. Mange A, Milhavel O, Umlauf D, Harris D, Lehmann S: **PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells.** *FEBS Lett* 2002, **514**(2-3):159-162.
50. Santucci A, Sytnyk V, Leshchynska I, Schachner M: **Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth.** *J Cell Biol* 2005, **169**(2):341-354.
51. Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C: **Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein.** *Nature* 1992, **356**(6370):577-582.
52. Coitinho AS, Roesler R, Martins VR, Brentani RR, Izquierdo I: **Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age.** *Neuroreport* 2003, **14**(10):1375-1379.
53. Criado JR, Sanchez-Alavez M, Conti B, Giacchino JL, Wills DN, Henriksen SJ, Race R, Manson JC, Chesebro B, Oldstone MB: **Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons.** *Neurobiol Dis* 2005, **19**(1-2):255-265.
54. Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC: **Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein.** *Nature* 1996, **380**(6575):639-642.
55. Brown DR, Besinger A: **Prion protein expression and superoxide dismutase activity.** *The Biochemical journal* 1998, **334** (Pt 2):423-429.
56. Anderson L, Rossi D, Linehan J, Brandner S, Weissmann C: **Transgene-driven expression of the Doppel protein in Purkinje cells causes Purkinje cell degeneration and motor impairment.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(10):3644-3649.
57. Roucou X, Gains M, LeBlanc AC: **Neuroprotective functions of prion protein.** *J Neurosci Res* 2004, **75**(2):153-161.
58. Roucou X, LeBlanc AC: **Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases.** *J Mol Med* 2005, **83**(1):3-11.
59. Hedman C, Lyahyai J, Filali H, Marin B, Serrano C, Monleon E, Moreno B, Zaragoza P, Badiola JJ, Martin-Burriel I *et al*: **Differential gene expression and apoptosis markers in presymptomatic scrapie affected sheep.** *Veterinary microbiology*, **159**(1-2):23-32.
60. Lyahyai J, Bolea R, Serrano C, Monleon E, Moreno C, Osta R, Zaragoza P, Badiola JJ, Martin-Burriel I: **Correlation between Bax overexpression and prion deposition in medulla oblongata from natural scrapie without evidence of apoptosis.** *Acta Neuropathol* 2006, **112**(4):451-460.
61. Lyahyai J, Bolea R, Serrano C, Vidal E, Pumarola M, Badiola JJ, Zaragoza P, Martin-Burriel I: **Differential expression and protein distribution of Bax in natural scrapie.** *Brain Res* 2007, **1180**:111-120.
62. Ballerini C, Gourdain P, Bachy V, Blanchard N, Levavasseur E, Gregoire S, Fontes P, Aucouturier P, Hivroz C, Carnaud C: **Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells.** *J Immunol* 2006, **176**(12):7254-7262.
63. de Almeida CJ, Chiarini LB, da Silva JP, PM ES, Martins MA, Linden R: **The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response.** *J Leukoc Biol* 2005, **77**(2):238-246.

64. Durig J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Rosenthal C, Schmucker U, Bieschke J, Duhrsen U, Kretzschmar HA: **Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes.** *Br J Haematol* 2000, **108**(3):488-495.
65. Politopoulou G, Seebach JD, Schmugge M, Schwarz HP, Aguzzi A: **Age-related expression of the cellular prion protein in human peripheral blood leukocytes.** *Haematologica* 2000, **85**(6):580-587.
66. Mattei V, Garofalo T, Misasi R, Circella A, Manganelli V, Lucania G, Pavan A, Sorice M: **Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation.** *FEBS Lett* 2004, **560**(1-3):14-18.
67. Bainbridge J, Walker KB: **The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses.** *Immunol Lett* 2005, **96**(1):147-150.
68. Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D *et al*: **Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis.** *Nature medicine* 2000, **6**(6):643-651.
69. Serrano C, Lyahyai J, Bolea R, Varona L, Monleon E, Badiola JJ, Zaragoza P, Martin-Burriel I: **Distinct spatial activation of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in natural scrapie: association with prion-related lesions.** *Veterinary research* 2009, **40**(5):42.
70. Cummings CJ, Mancini MA, Antalffy B, DeFranco DB, Orr HT, Zoghbi HY: **Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1.** *Nat Genet* 1998, **19**(2):148-154.
71. Ii K, Ito H, Tanaka K, Hirano A: **Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly.** *J Neuropathol Exp Neurol* 1997, **56**(2):125-131.
72. Arispe N, Rojas E, Pollard HB: **Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(2):567-571.
73. Lin MC, Mirzabekov T, Kagan BL: **Channel formation by a neurotoxic prion protein fragment.** *J Biol Chem* 1997, **272**(1):44-47.
74. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D: **Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity.** *Cell* 1994, **77**(6):817-827.
75. Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, Wong J, Takenouchi T, Hashimoto M, Masliah E: **alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress.** *Am J Pathol* 2000, **157**(2):401-410.
76. Serrano C, Bolea R, Lyahyai J, Filali H, Varona L, Marcos-Carcavilla A, Acin C, Calvo JH, Serrano M, Badiola JJ *et al*: **Changes in HSP gene and protein expression in natural scrapie with brain damage.** *Veterinary research*, **42**(1):13.
77. Bolea R, Hortells P, Martin-Burriel I, Vargas A, Ryffel B, Monzon M, Badiola JJ: **Consequences of dietary manganese and copper imbalance on neuronal apoptosis in a murine model of scrapie.** *Neuropathol Appl Neurobiol*, **36**(4):300-311.
78. Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J: **129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal.** *Mol Neurobiol* 1994, **8**(2-3):121-127.
79. Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG, Collinge J: **Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration.** *EMBO J* 2002, **21**(3):202-210.
80. Paitel E, Alves da Costa C, Vilette D, Grassi J, Checler F: **Overexpression of PrPc triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies.** *J Neurochem* 2002, **83**(5):1208-1214.
81. Paitel E, Fahraeus R, Checler F: **Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation.** *J Biol Chem* 2003, **278**(12):10061-10066.

82. Ma J, Wollmann R, Lindquist S: **Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol.** *Science* 2002, **298**(5599):1781-1785.
83. Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A, Kastan MB, Griffin DE, Earnshaw WC, Velicuona MA *et al*: **Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(2):554-559.
84. Roucou X, Guo Q, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc AC: **Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons.** *J Biol Chem* 2003, **278**(42):40877-40881.
85. Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, Kretzschmar HA: **Role of microglia in neuronal cell death in prion disease.** *Brain Pathol* 1998, **8**(3):449-457.
86. Mabbott NA, Mackay F, Minns F, Bruce ME: **Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie.** *Nature medicine* 2000, **6**(7):719-720.
87. Heppner FL, Prinz M, Aguzzi A: **Pathogenesis of prion diseases: possible implications of microglial cells.** *Progress in brain research* 2001, **132**:737-750.
88. Ferrer I, Puig B, Blanco R, Marti E: **Prion protein deposition and abnormal synaptic protein expression in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease.** *Neuroscience* 2000, **97**(4):715-726.
89. Ferrer I: **Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease.** *Cerebellum* 2002, **1**(3):213-222.
90. Vidal E, Acin C, Foradada L, Monzon M, Marquez M, Monleon E, Pumarola M, Badiola JJ, Bolea R: **Immunohistochemical characterisation of classical scrapie neuropathology in sheep.** *J Comp Pathol* 2009, **141**(2-3):135-146.
91. Clinton J, Forsyth C, Royston MC, Roberts GW: **Synaptic degeneration is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminary study.** *Neuroreport* 1993, **4**(1):65-68.
92. Jeffrey M, Halliday WG, Bell J, Johnston AR, MacLeod NK, Ingham C, Sayers AR, Brown DA, Fraser JR: **Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus.** *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000, **26**(1):41-54.
93. Parry HB: **Clinical features of natural scrapie.** In: *Scrapie disease in sheep.* Academic Press 1983:Oppenheimer, D. R., London. pp 60-89.
94. Pattison IH, Millson GC: **Further observations on the experimental production of scrapie in goats and sheep.** *J Comp Pathol* 1960, **70**:182-193.
95. Miller L.D. LW, Taylor W.D.: **Scrapie: procedures for laboratory diagnosis.** In: *28th Annual Proceedings.* American Association Veterinary Laboratory Diagnosticians; 1985: 417-420.
96. Bolea R, Monleon E, Schiller I, Raeber AJ, Acin C, Monzon M, Martin-Burriel I, Struckmeyer T, Oesch B, Badiola JJ: **Comparison of immunohistochemistry and two rapid tests for detection of abnormal prion protein in different brain regions of sheep with typical scrapie.** *J Vet Diagn Invest* 2005, **17**(5):467-469.
97. Fraser H: **The pathology of a natural and experimental scrapie.** *Frontiers of biology* 1976, **44**:267-305.
98. Foster JD, Wilson M, Hunter N: **Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie.** *Vet Rec* 1996, **139**(21):512-515.
99. Monleon E, Monzon M, Hortells P, Bolea R, Acin C, Vargas F, Badiola JJ: **Approaches to Scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems.** *J Virol Methods* 2005, **125**(2):165-171.
100. Bendheim PE, Barry RA, DeArmond SJ, Stites DP, Prusiner SB: **Antibodies to a scrapie prion protein.** *Nature* 1984, **310**(5976):418-421.
101. Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA: **Preclinical test for prion diseases.** *Nature* 1996, **381**(6583):563.
102. O'Rourke KI, Baszler TV, Parish SM, Knowles DP: **Preclinical detection of PrPSc in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep.** *Vet Rec* 1998, **142**(18):489-491.

103. Vargas F, Lujan L, Bolea R, Monleon E, Martin-Burriel I, Fernandez A, De Blas I, Badiola JJ: **Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy.** *J Vet Intern Med* 2006, **20**(1):187-193.
104. Monleon E, Garza MC, Sarasa R, Alvarez-Rodriguez J, Bolea R, Monzon M, Vargas MA, Badiola JJ, Acin C: **An assessment of the efficiency of PrPsc detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with scrapie.** *Veterinary microbiology*, **147**(3-4):237-243.
105. Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K: **Abnormal fibrils from scrapie-infected brain.** *Acta Neuropathol* 1981, **54**(1):63-74.
106. Stack MJ, Scott AC, Done SH, Dawson M: **Natural scrapie: detection of fibrils in extracts from the central nervous system of sheep.** *Vet Rec* 1991, **128**(23):539-540.
107. Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K: **NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231).** *Nature* 1996, **382**(6587):180-182.
108. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE *et al*: **Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(23):10962-10966.
109. Grassi J: **Pre-clinical diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies using rapid tests.** *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine* 2003, **10**(1):19-22.
110. Deslys JP, Grassi J: **[Screening tests for animal TSE: present and future].** *Pathologie-biologie* 2005, **53**(4):221-228.
111. Race R, Jenny A, Sutton D: **Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis.** *The Journal of infectious diseases* 1998, **178**(4):949-953.
112. Saborio GP, Permann B, Soto C: **Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding.** *Nature* 2001, **411**(6839):810-813.
113. Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R: **A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases.** *J Biol Chem* 2001, **276**(34):31479-31482.
114. Rubenstein R, Chang B, Gray P, Piltch M, Bulgin MS, Sorensen-Melson S, Miller MW: **Prion disease detection, PMCA kinetics, and IgG in urine from sheep naturally/experimentally infected with scrapie and deer with preclinical/clinical chronic wasting disease.** *Journal of virology* 2011, **85**(17):9031-9038.
115. Hochstrasser DF, Frutiger S, Wilkins MR, Hughes G, Sanchez JC: **Elevation of apolipoprotein E in the CSF of cattle affected by BSE.** *FEBS Lett* 1997, **416**(2):161-163.
116. Dickinson AG, Fraser H: **Scrapie: effect of Dh gene on incubation period of extraneurally injected agent.** *Heredity* 1972, **29**(1):91-93.
117. Dickinson AG: **Scrapie in sheep and goats.** *Frontiers of biology* 1976, **44**:209-241.
118. Carp RI, Moretz RC, Natelli M, Dickinson AG: **Genetic control of scrapie: incubation period and plaque formation in I mice.** *J Gen Virol* 1987, **68** (Pt 2):401-407.
119. Clarke MC, Kimberlin RH: **Pathogenesis of mouse scrapie: distribution of agent in the pulp and stroma of infected spleens.** *Veterinary microbiology* 1984, **9**(3):215-225.
120. Collinge J: **Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis.** *Annu Rev Neurosci* 2001, **24**:519-550.
121. Carp RI, Callahan SM: **Variation in the characteristics of 10 mouse-passaged scrapie lines derived from five scrapie-positive sheep.** *J Gen Virol* 1991, **72** (Pt 2):293-298.
122. Kimberlin RH, Walker CA: **Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture.** *J Gen Virol* 1978, **39**(3):487-496.

123. Foster JD, Dickinson AG: **The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie.** *Vet Rec* 1988, **123**(1):5-8.
124. Hunter N, Hope J, McConnell I, Dickinson AG: **Linkage of the scrapie-associated fibril protein (PrP) gene and Sinc using congenic mice and restriction fragment length polymorphism analysis.** *J Gen Virol* 1987, **68** (Pt 10):2711-2716.
125. Kimberlin RH, Walker C: **Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster.** *J Gen Virol* 1977, **34**(2):295-304.
126. Bruce ME, Dickinson AG: **Biological evidence that scrapie agent has an independent genome.** *J Gen Virol* 1987, **68** (Pt 1):79-89.
127. Bruce ME, McBride PA, Farquhar CF: **Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie.** *Neurosci Lett* 1989, **102**(1):1-6.
128. Dickinson AG, Fraser H, Meikle VM, Outram GW: **Competition between different scrapie agents in mice.** *Nature: New biology* 1972, **237**(77):244-245.
129. Dickinson AG, Fraser H, McConnell I, Outram GW, Sales DI, Taylor DM: **Extraneural competition between different scrapie agents leading to loss of infectivity.** *Nature* 1975, **253**(5492):556.
130. Dickinson AG, Fraser H, Outram GW: **Scrapie incubation time can exceed natural lifespan.** *Nature* 1975, **256**(5520):732-733.
131. Fraser H, Dickinson AG: **Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation.** *J Comp Pathol* 1973, **83**(1):29-40.
132. Jeffrey M, Martin S, Thomson JR, Dingwall WS, Begara-McGorum I, Gonzalez L: **Onset and distribution of tissue prp accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies.** *J Comp Pathol* 2001, **125**(1):48-57.
133. Jeffrey M, Martin S, Barr J, Chong A, Fraser JR: **Onset of accumulation of PrPres in murine ME7 scrapie in relation to pathological and PrP immunohistochemical changes.** *J Comp Pathol* 2001, **124**(1):20-28.
134. Gonzalez L, Martin S, Jeffrey M: **Distinct profiles of PrP(d) immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing.** *J Gen Virol* 2003, **84**(Pt 5):1339-1350.
135. Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B: **Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98.** *Vet Rec* 2003, **153**(7):202-208.
136. Novak M, Vrtiak OJ, Mikula I, Tkacikova L: **Ovine scrapie: priorities and importance.** *Folia Microbiol (Praha)* 2000, **45**(6):475-483.
137. Baron T, Vulin J, Biacabe AG, Lakhdar L, Verchere J, Torres JM, Bencsik A: **Emergence of classical BSE strain properties during serial passages of H-BSE in wild-type mice.** *PloS one* 2011, **6**(1):e15839.
138. Yokoyama T, Mohri S: **Prion diseases and emerging prion diseases.** *Current medicinal chemistry* 2008, **15**(9):912-916.
139. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C *et al*: **Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent.** *Nature* 1997, **389**(6650):498-501.
140. Imran M, Mahmood S: **An overview of animal prion diseases.** *Virology journal* 2011, **8**:493.
141. Plinston C, Hart P, Chong A, Hunter N, Foster J, Piccardo P, Manson JC, Barron RM: **Increased susceptibility of human-PrP transgenic mice to bovine spongiform encephalopathy infection following passage in sheep.** *Journal of virology* 2011, **85**(3):1174-1181.
142. Hunter N, Foster JD, Dickinson AG, Hope J: **Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep.** *Vet Rec* 1989, **124**(14):364-366.

143. Oidtmann B, Simon D, Holtkamp N, Hoffmann R, Baier M: **Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologues to tetrapod prion proteins.** *FEBS Lett* 2003, **538**(1-3):96-100.
144. Rivera-Milla E, Stuermer CA, Malaga-Trillo E: **An evolutionary basis for scrapie disease: identification of a fish prion mRNA.** *Trends Genet* 2003, **19**(2):72-75.
145. Simonic T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Ceciliani F, Ronchi S: **cDNA cloning of turtle prion protein.** *FEBS Lett* 2000, **469**(1):33-38.
146. Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T: **Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein.** *FEBS Lett* 2001, **508**(2):170-174.
147. Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schatzl HM: **Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein.** *J Mol Biol* 1999, **289**(5):1163-1178.
148. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB: **Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid.** *Cell* 1987, **51**(2):229-240.
149. Harris DA: **Cellular biology of prion diseases.** *Clin Microbiol Rev* 1999, **12**(3):429-444.
150. Baylis M, Goldmann W: **The genetics of scrapie in sheep and goats.** *Curr Mol Med* 2004, **4**(4):385-396.
151. Hunter N: **Scrapie: uncertainties, biology and molecular approaches.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1772**(6):619-628.
152. Goldmann W, Hunter N, Foster JD, Salbaum JM, Beyreuther K, Hope J: **Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, **87**(7):2476-2480.
153. Goldmann W, Hunter N, Benson G, Foster JD, Hope J: **Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene.** *J Gen Virol* 1991, **72** (Pt 10):2411-2417.
154. Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J, Hope J: **PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie.** *J Gen Virol* 1994, **75** (Pt 5):989-995.
155. Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, Bos-de Ruijter J, Gielkens AL, Smits MA: **Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie.** *J Gen Virol* 1995, **76** (Pt 3):509-517.
156. Ikeda T, Horiuchi M, Ishiguro N, Muramatsu Y, Kai-Uwe GD, Shinagawa M: **Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan.** *J Gen Virol* 1995, **76** (Pt 10):2577-2581.
157. Acin C, Martin-Burriel I, Goldmann W, Lyahyai J, Monzon M, Bolea R, Smith A, Rodellar C, Badiola JJ, Zaragoza P: **Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep.** *J Gen Virol* 2004, **85**(Pt 7):2103-2110.
158. Acin C, Martin-Burriel I, Monleon E, Rodellar C, Badiola JJ, Zaragoza P: **PrP polymorphisms in Spanish sheep affected with natural scrapie.** *Vet Rec* 2004, **155**(12):370-372.
159. Serrano C, Martin-Burriel I, Lyahyai J, Monzon M, El Hamidi M, Acin C, Badiola JJ, Tligui N, Zaragoza P: **Polymorphisms of the PRNP gene in Moroccan sheep breeds.** *Vet Rec* 2007, **161**(15):524-525.
160. Acutis PL, Sbaiz L, Verburg F, Riina MV, Ru G, Moda G, Caramelli M, Bossers A: **Low frequency of the scrapie resistance-associated allele and presence of lysine-171 allele of the prion protein gene in Italian Biellese ovine breed.** *J Gen Virol* 2004, **85**(Pt 10):3165-3172.
161. DEFRA: **UK National Scrapie Plan risk groups.** 2003:<http://www.defra.gov.uk/nsp>
162. Foster J, Goldmann W, Parnham D, Chong A, Hunter N: **Partial dissociation of PrP(Sc) deposition and vacuolation in the brains of scrapie and BSE experimentally affected goats.** *J Gen Virol* 2001, **82**(Pt 1):267-273.

163. Hunter N, Foster JD, Goldmann W, Stear MJ, Hope J, Bostock C: **Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes.** *Arch Virol* 1996, **141**(5):809-824.
164. Carlson GA, Kingsbury DT, Goodman PA, Coleman S, Marshall ST, DeArmond S, Westaway D, Prusiner SB: **Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes.** *Cell* 1986, **46**(4):503-511.
165. Hunter N, Goldmann W, Smith G, Hope J: **The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie.** *Arch Virol* 1994, **137**(1-2):171-177.
166. Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P *et al*: **Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects.** *Ann Neurol* 1999, **46**(2):224-233.
167. Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, de Silva R, Esmonde T, Will R, Springbett A, Campbell TA, Sidle KC *et al*: **Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene.** *Hum Genet* 1996, **98**(3):259-264.
168. Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Benestad SL: **Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases.** *J Gen Virol* 2005, **86**(Pt 1):231-235.
169. Buschmann A, Luhken G, Schultz J, Erhardt G, Groschup MH: **Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR).** *J Gen Virol* 2004, **85**(Pt 9):2727-2733.
170. Everest SJ, Thorne L, Barnicle DA, Edwards JC, Elliott H, Jackman R, Hope J: **Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme.** *J Gen Virol* 2006, **87**(Pt 2):471-477.
171. Orge L, Galo A, Machado C, Lima C, Ochoa C, Silva J, Ramos M, Simas JP: **Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal.** *J Gen Virol* 2004, **85**(Pt 11):3487-3491.
172. DEFRA: **Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) in Great Britain.** 2005:Editor P. Burke, Defra publications, London.
173. Bossers A, Schreuder BE, Muileman IH, Belt PB, Smits MA: **PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie.** *J Gen Virol* 1996, **77** (Pt 10):2669-2673.
174. Cloucard C, Beaudry P, Elsen JM, Milan D, Dussaucy M, Bounneau C, Schelcher F, Chatelain J, Launay JM, Laplanche JL: **Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie.** *J Gen Virol* 1995, **76** (Pt 8):2097-2101.
175. Goldmann W, Martin T, Foster J, Hughes S, Smith G, Hughes K, Dawson M, Hunter N: **Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period.** *J Gen Virol* 1996, **77** (Pt 11):2885-2891.
176. Groschup MH, Lacroux C, Buschmann A, Luhken G, Mathey J, Eiden M, Luga S, Hoffmann C, Espinosa JC, Baron T *et al*: **Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**(8):1201-1207.
177. Andreoletti O, Morel N, Lacroux C, Rouillon V, Barc C, Tabouret G, Sarradin P, Berthon P, Bernardet P, Mathey J *et al*: **Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep.** *J Gen Virol* 2006, **87**(Pt 4):1043-1046.
178. Houston F, Goldmann W, Chong A, Jeffrey M, Gonzalez L, Foster J, Parnham D, Hunter N: **Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection.** *Nature* 2003, **423**(6939):498.
179. Beranger F, Mange A, Solassol J, Lehmann S: **Cell culture models of transmissible spongiform encephalopathies.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **289**(2):311-316.
180. Ghaemmaghani S, Phuan PW, Perkins B, Ullman J, May BC, Cohen FE, Prusiner SB: **Cell division modulates prion accumulation in cultured cells.** *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(46):17971-17976.
181. Nishida N, Harris DA, Vilette D, Laude H, Frobert Y, Grassi J, Casanova D, Milhavet O, Lehmann S: **Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein.** *Journal of virology* 2000, **74**(1):320-325.
 182. Clarke MC, Haig DA: **Evidence for the multiplication of scrapie agent in cell culture.** *Nature* 1970, **225**(5227):100-101.
 183. Race RE, Fadness LH, Chesebro B: **Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells.** *J Gen Virol* 1987, **68** (Pt 5):1391-1399.
 184. Butler DA, Scott MR, Bockman JM, Borchelt DR, Taraboulos A, Hsiao KK, Kingsbury DT, Prusiner SB: **Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins.** *Journal of virology* 1988, **62**(5):1558-1564.
 185. Follet J, Lemaire-Vieille C, Blanquet-Grossard F, Podevin-Dimster V, Lehmann S, Chauvin JP, Decavel JP, Varea R, Grassi J, Fontes M *et al*: **PrP expression and replication by Schwann cells: implications in prion spreading.** *Journal of virology* 2002, **76**(5):2434-2439.
 186. Birkett CR, Hennion RM, Bembridge DA, Clarke MC, Chree A, Bruce ME, Bostock CJ: **Scrapie strains maintain biological phenotypes on propagation in a cell line in culture.** *EMBO J* 2001, **20**(13):3351-3358.
 187. Schatzl HM, Laszlo L, Holtzman DM, Tatzelt J, DeArmond SJ, Weiner RI, Mobley WC, Prusiner SB: **A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis.** *Journal of virology* 1997, **71**(11):8821-8831.
 188. Taraboulos A, Raeber AJ, Borchelt DR, Serban D, Prusiner SB: **Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells.** *Mol Biol Cell* 1992, **3**(8):851-863.
 189. Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B: **Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(21):12117-12122.
 190. Caughey B, Brown K, Raymond GJ, Katzenstein GE, Thresher W: **Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red [corrected].** *Journal of virology* 1994, **68**(4):2135-2141.
 191. Solassol J, Crozet C, Lehmann S: **Prion propagation in cultured cells.** *Br Med Bull* 2003, **66**:87-97.
 192. Vilette D, Andreoletti O, Archer F, Madelaine MF, Vilotte JL, Lehmann S, Laude H: **Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(7):4055-4059.
 193. Archer F, Bachelin C, Andreoletti O, Besnard N, Perrot G, Langevin C, Le Dur A, Vilette D, Baron-Van Evercooren A, Vilotte JL *et al*: **Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection.** *Journal of virology* 2004, **78**(1):482-490.
 194. Laude H, Vilette D, Le Dur A, Archer F, Soulier S, Besnard N, Essalmani R, Vilotte JL: **New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives.** *C R Biol* 2002, **325**(1):49-57.
 195. Hunter N: **PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE.** *Trends Microbiol* 1997, **5**(8):331-334.
 196. Kaul M, Garden GA, Lipton SA: **Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia.** *Nature* 2001, **410**(6831):988-994.
 197. Cronier S, Laude H, Peyrin JM: **Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(33):12271-12276.
 198. Milhavet O, McMahon HE, Rachidi W, Nishida N, Katamine S, Mange A, Arlotto M, Casanova D, Riondel J, Favier A *et al*: **Prion infection impairs the cellular response**

- to oxidative stress.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(25):13937-13942.
199. Milhavet O, Casanova D, Chevallier N, McKay RD, Lehmann S: **Neural stem cell model for prion propagation.** *Stem Cells* 2006, **24**(10):2284-2291.
 200. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S: **A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes.** *J Neurosci* 1992, **12**(11):4565-4574.
 201. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL: **Direct isolation of human central nervous system stem cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(26):14720-14725.
 202. Giri RK, Young R, Pitstick R, DeArmond SJ, Prusiner SB, Carlson GA: **Prion infection of mouse neurospheres.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(10):3875-3880.
 203. Herva ME, Relano-Gines A, Villa A, Torres JM: **Prion infection of differentiated neurospheres.** *J Neurosci Methods* 2010, **188**(2):270-275.
 204. Duittoz AH, Hevor T: **Primary culture of neural precursors from the ovine central nervous system (CNS).** *J Neurosci Methods* 2001, **107**(1-2):131-140.
 205. Reynolds BA, Weiss S: **Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.** *Science* 1992, **255**(5052):1707-1710.
 206. Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH: **Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004, **44**:399-421.
 207. Danilov AI, Covacu R, Moe MC, Langmoen IA, Johansson CB, Olsson T, Brundin L: **Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis.** *Eur J Neurosci* 2006, **23**(2):394-400.
 208. Akimov S, Yakovleva O, Vasilyeva I, McKenzie C, Cervenakova L: **Persistent propagation of variant Creutzfeldt-Jakob disease agent in murine spleen stromal cell culture with features of mesenchymal stem cells.** *Journal of virology* 2008, **82**(21):10959-10962.
 209. Akimov S, Vasilyeva I, Yakovleva O, McKenzie C, Cervenakova L: **Murine bone marrow stromal cell culture with features of mesenchymal stem cells susceptible to mouse-adapted human TSE agent, Fukuoka-1.** *Folia Neuropathol* 2009, **47**(2):205-214.
 210. Takakura Y, Yamaguchi N, Nakagaki T, Satoh K, Kira J, Nishida N: **Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **377**(3):957-961.
 211. Brown P, Gibbs CJ, Jr., Rodgers-Johnson P, Asher DM, Sulima MP, Bacote A, Goldfarb LG, Gajdusek DC: **Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease.** *Ann Neurol* 1994, **35**(5):513-529.
 212. Maignien T, Lasmezas CI, Beringue V, Dormont D, Deslys JP: **Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents.** *J Gen Virol* 1999, **80** (Pt 11):3035-3042.
 213. Bannach O, Birkmann E, Reinartz E, Jaeger KE, Langeveld JP, Rohwer RG, Gregori L, Terry LA, Willbold D, Riesner D: **Detection of prion protein particles in blood plasma of scrapie infected sheep.** *PloS one*, **7**(5):e36620.
 214. Deng YB, Liu XG, Liu ZG, Liu XL, Liu Y, Zhou GQ: **Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys.** *Cytotherapy* 2006, **8**(3):210-214.
 215. Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S: **Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation.** *Stem Cells* 2007, **25**(11):2837-2844.

216. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS: **The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.** *Cell Tissue Kinet* 1970, **3**(4):393-403.
217. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA: **Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.** *Blood* 1980, **56**(2):289-301.
218. Kaneko S, Motomura S, Ibayashi H: **Differentiation of human bone marrow-derived fibroblastoid colony forming cells (CFU-F) and their roles in haemopoiesis in vitro.** *Br J Haematol* 1982, **51**(2):217-225.
219. Caplan AI: **Mesenchymal stem cells.** *J Orthop Res* 1991, **9**(5):641-650.
220. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI: **The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks.** *Clin Orthop Relat Res* 1991(262):298-311.
221. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**(12):4279-4295.
222. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy* 2006, **8**(4):315-317.
223. De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A: **Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity.** *Theriogenology*, **75**(8):1431-1443.
224. Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vazquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martin-Burriel I: **Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue.** *Veterinary immunology and immunopathology* 2011, **144**(1-2):147-154.
225. Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, Gimble JM: **Differentiation of adipose stem cells.** *Methods Mol Biol* 2008, **456**:155-171.
226. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN: **Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals.** *Arthritis research* 2000, **2**(6):477-488.
227. Lama VN, Smith L, Badri L, Flint A, Andrei AC, Murray S, Wang Z, Liao H, Toews GB, Krebsbach PH *et al*: **Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts.** *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(4):989-996.
228. Adachi N, Sato K, Usas A, Fu FH, Ochi M, Han CW, Niyibizi C, Huard J: **Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects.** *The Journal of rheumatology* 2002, **29**(9):1920-1930.
229. Bernard-Beaubois K, Hecquet C, Houcine O, Hayem G, Adolphe M: **Culture and characterization of juvenile rabbit tenocytes.** *Cell Biol Toxicol* 1997, **13**(2):103-113.
230. Galmiche MC, Koteliensky VE, Briere J, Herve P, Charbord P: **Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway.** *Blood* 1993, **82**(1):66-76.
231. Sekiya I, Muneta T, Koga H, Nimura A, Morito T, Shimaya M, Mochizuki T, Segawa Y, Sakaguchi Y, Tsuji K *et al*: **[Articular cartilage regeneration with synovial mesenchymal stem cells].** *Clinical calcium* 2011, **21**(6):879-889.
232. Rentsch C, Hess R, Rentsch B, Hofmann A, Manthey S, Scharnweber D, Biewener A, Zwipp H: **Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds.** *In vitro cellular & developmental biology Animal* 2010, **46**(7):624-634.

233. McCarty RC, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK, Xian CJ: **Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells.** *Journal of cellular physiology* 2009, **219**(2):324-333.
234. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P: **Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma.** *Biomaterials* 2010, **31**(13):3572-3579.
235. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG: **Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications.** *Stem Cells* 2001, **19**(3):180-192.
236. Lee HS, Huang GT, Chiang H, Chiou LL, Chen MH, Hsieh CH, Jiang CC: **Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis.** *Stem Cells* 2003, **21**(2):190-199.
237. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G *et al*: **Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers.** *Stem Cells* 2006, **24**(2):376-385.
238. Martinez-Lorenzo MJ, Royo-Canas M, Alegre-Aguaron E, Desportes P, Castiella T, Garcia-Alvarez F, Larrad L: **Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species.** *J Orthop Res* 2009, **27**(11):1499-1507.
239. Rhodes NP, Srivastava JK, Smith RF, Longinotti C: **Heterogeneity in proliferative potential of ovine mesenchymal stem cell colonies.** *Journal of materials science Materials in medicine* 2004, **15**(4):397-402.
240. Baksh D, Song L, Tuan RS: **Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy.** *J Cell Mol Med* 2004, **8**(3):301-316.
241. Noel D, Caton D, Roche S, Bony C, Lehmann S, Casteilla L, Jorgensen C, Cousin B: **Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials.** *Experimental cell research* 2008, **314**(7):1575-1584.
242. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K: **Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.** *Stem Cells* 2006, **24**(5):1294-1301.
243. Mrugala D, Bony C, Neves N, Caillot L, Fabre S, Moukoko D, Jorgensen C, Noel D: **Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model.** *Annals of the rheumatic diseases* 2008, **67**(3):288-295.
244. Deans RJ, Moseley AB: **Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses.** *Experimental hematology* 2000, **28**(8):875-884.
245. Montzka K, Lassonczyk N, Tschoke B, Neuss S, Fuhrmann T, Franzen R, Smeets R, Brook GA, Woltje M: **Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression.** *BMC neuroscience* 2009, **10**:16.
246. Fernyhough ME, Okine E, Hausman G, Vierck JL, Dodson MV: **PPARgamma and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte.** *Domest Anim Endocrinol* 2007, **33**(4):367-378.
247. Jager M, Bachmann R, Scharfstadt A, Krauspe R: **Ovine cord blood accommodates multipotent mesenchymal progenitor cells.** *In Vivo* 2006, **20**(2):205-214.
248. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K *et al*: **PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors.** *The Journal of clinical investigation* 2004, **113**(6):846-855.
249. Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM: **Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization.** *Calcif Tissue Int* 1992, **51**(4):305-311.

250. Beck GR, Jr., Zerler B, Moran E: **Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(15):8352-8357.
251. Feitosa ML, Fadel L, Beltrao-Braga PC, Wenceslau CV, Kerkis I, Kerkis A, Birgel Junior EH, Martins JF, Martins Ddos S, Miglino MA *et al*: **Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head: preliminary results.** *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* 2010, **25**(5):416-422.
252. Marquass B, Schulz R, Hepp P, Zscharnack M, Aigner T, Schmidt S, Stein F, Richter R, Osterhoff G, Aust G *et al*: **Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year.** *The American journal of sports medicine* 2011, **39**(7):1401-1412.
253. Zannettino AC, Paton S, Itescu S, Gronthos S: **Comparative assessment of the osteoconductive properties of different biomaterials in vivo seeded with human or ovine mesenchymal stem/stromal cells.** *Tissue engineering Part A* 2010, **16**(12):3579-3587.
254. Xu Y, Malladi P, Chiou M, Bekerman E, Giaccia AJ, Longaker MT: **In vitro expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis.** *Tissue Eng* 2007, **13**(12):2981-2993.
255. Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, Richter W: **Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6.** *Journal of cellular physiology* 2007, **211**(3):682-691.
256. Ranera B, Ordovas L, Lyahyai J, Bernal ML, Fernandes F, Remacha AR, Romero A, Vazquez FJ, Osta R, Cons C *et al*: **Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells.** *Equine veterinary journal* 2012, **44**(1):33-42.
257. Mantovani C, Raimondo S, Haneef MS, Geuna S, Terenghi G, Shawcross SG, Wiberg M: **Morphological, molecular and functional differences of adult bone marrow- and adipose-derived stem cells isolated from rats of different ages.** *Experimental cell research* 2012, **318**(16):2034-2048.
258. Ryu HH, Kang BJ, Park SS, Kim Y, Sung GJ, Woo HM, Kim WH, Kweon OK: **Comparison of Mesenchymal Stem Cells Derived from Fat, Bone Marrow, Wharton's Jelly, and Umbilical Cord Blood for Treating Spinal Cord Injuries in Dogs.** *J Vet Med Sci* 2012.
259. Woodbury D, Reynolds K, Black IB: **Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis.** *J Neurosci Res* 2002, **69**(6):908-917.
260. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N *et al*: **Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro.** *Exp Neurol* 2000, **164**(2):247-256.
261. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ: **In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **282**(1):148-152.
262. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC: **Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats.** *Exp Neurol* 2002, **174**(1):11-20.
263. Mareschi K, Novara M, Rustichelli D, Ferrero I, Guido D, Carbone E, Medico E, Madon E, Vercelli A, Fagioli F: **Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K⁺ channel types.** *Experimental hematology* 2006, **34**(11):1563-1572.
264. Ranera B, Ordovás L, Lyahyai J, Bernal ML, Fernandes F, Romero A, Vázquez FJ, Osta R, Cons C, Varona L *et al*: **Comparative study of equine bone marrow- and**

- adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.** *Equine veterinary journal* 2011, in press.
265. Wang X, Moutsoglou D: **Osteogenic and adipogenic differentiation potential of an immortalized fibroblast-like cell line derived from porcine peripheral blood.** *In vitro cellular & developmental biology Animal* 2009, **45**(10):584-591.
 266. Spaas JH, Schauwer CD, Cornillie P, Meyer E, Soom AV, Van de Walle GR: **Culture and characterisation of equine peripheral blood mesenchymal stromal cells.** *Vet J* 2012.
 267. Wang H, Pang B, Li Y, Zhu D, Pang T, Liu Y: **Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells.** *Cytotherapy* 2012, **14**(4):423-430.
 268. Radcliffe CH, Flaminio MJ, Fortier LA: **Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations.** *Stem Cells Dev* 2010, **19**(2):269-282.
 269. Rallapalli S, Bishi DK, Verma RS, Cherian KM, Guhathakurta S: **A multiplex PCR technique to characterize human bone marrow derived mesenchymal stem cells.** *Biotechnol Lett* 2009, **31**(12):1843-1850.
 270. Valenti MT, Dalle Carbonare L, Donatelli L, Bertoldo F, Zanatta M, Lo Cascio V: **Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells.** *Bone* 2008, **43**(6):1084-1092.
 271. Bian ZY, Li G, Gan YK, Hao YQ, Xu WT, Tang TT: **Increased number of mesenchymal stem cell-like cells in peripheral blood of patients with bone sarcomas.** *Arch Med Res* 2009, **40**(3):163-168.
 272. Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vazquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martin-Burriel I: **Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue.** *Vet Immunol Immunopathol* 2011.
 273. Seo JB, Moon HM, Kim WS, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, Ham J, Kang H, Park MG, Steffensen KR *et al*: **Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression.** *Molecular and cellular biology* 2004, **24**(8):3430-3444.
 274. Aguilar V, Annicotte JS, Escote X, Vendrell J, Langin D, Fajas L: **Cyclin G2 regulates adipogenesis through PPAR gamma coactivation.** *Endocrinology* 2010, **151**(11):5247-5254.
 275. Menssen A, Haupl T, Sittlinger M, Delorme B, Charbord P, Ringe J: **Differential gene expression profiling of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during adipogenic development.** *BMC Genomics* 2011, **12**:461.
 276. Kim YC, Ntambi JM: **Regulation of stearyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **266**(1):1-4.
 277. Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, Song Y, Tuan RS: **Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism.** *J Cell Biochem* 2009, **108**(3):577-588.
 278. Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS: **Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency.** *Stem Cells* 2006, **24**(7):1707-1718.
 279. Jikko A, Harris SE, Chen D, Mendrick DL, Damsky CH: **Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2.** *J Bone Miner Res* 1999, **14**(7):1075-1083.
 280. Liu F, Akiyama Y, Tai S, Maruyama K, Kawaguchi Y, Muramatsu K, Yamaguchi K: **Changes in the expression of CD106, osteogenic genes, and transcription factors involved in the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells.** *J Bone Miner Metab* 2008, **26**(4):312-320.
 281. Zou L, Zou X, Chen L, Li H, Mygind T, Kassem M, Bunger C: **Multilineage differentiation of porcine bone marrow stromal cells associated with specific gene expression pattern.** *J Orthop Res* 2008, **26**(1):56-64.

282. Sollazzo V, Palmieri A, Scapoli L, Martinelli M, Girardi A, Pellati A, Scarano A, Perrotti V, Spinelli G, Carinci F: **Allogro® acts on stem cells derived from peripheral blood.** *The Internet Journal of Dental Science* 2009, **8**(1).
283. Aubin JE: **Bone stem cells.** *J Cell Biochem Suppl* 1998, **30-31**:73-82.
284. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB: **Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.** *J Neurosci Res* 2000, **61**(4):364-370.
285. Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Delilieri GL, Silani V, Soligo D, Polli E: **Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro.** *Exp Neurol* 2005, **193**(2):312-325.
286. Jori FP, Napolitano MA, Melone MA, Cipollaro M, Cascino A, Altucci L, Peluso G, Giordano A, Galderisi U: **Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells.** *J Cell Biochem* 2005, **94**(4):645-655.
287. Loubet D, Dakowski C, Pietri M, Pradines E, Bernard S, Callebert J, Ardila-Osorio H, Mouillet-Richard S, Launay JM, Kellermann O *et al*: **Neuritogenesis: the prion protein controls beta1 integrin signaling activity.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2011.

